

ETUDE DE LA DIFFUSION DE NANOPARTICULES FERROMAGNETIQUES DANS LE FEMUR DU MOUTON

Application au traitement de tumeurs osseuses

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Vasco DA SILVA SANTOS
Né, le 4 octobre 1978 à POMBAL (PORTUGAL)

Directeur de thèse : **Monsieur le Docteur Didier MATHON**

JURY

PRESIDENT :
M. Paul BONNEVIALLE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :
M. Didier MATHON
M. André AUTEFAGE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Toulouse, 2004

NOM : Da Silva Santos

PRENOM : Vasco

TITRE : Étude de la diffusion de nanoparticules ferromagnétiques dans le fémur de mouton.

Application au traitement de tumeurs osseuses.

RESUME :

L'hyperthermie est une forme de développement récent du traitement des tumeurs osseuses où des particules ferromagnétiques soumises à un champ magnétique alternatif s'échauffent à des températures de l'ordre de 50°C et détruisent les cellules se trouvant dans leur environnement immédiat.

Cette stratégie est potentiellement applicable aux tumeurs osseuses. L'objet de ce travail est d'approcher les mécanismes de séquestration tissulaire et cellulaire des nanoparticules qui commencent à être compris, dans l'optique d'en faire un outil thérapeutique.

Dans la première partie, l'auteur fait quelques rappels ciblés sur l'épidémiologie, les aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques des tumeurs squelettiques des carnivores domestiques. Il souligne l'insuffisance et les nombreux effets secondaires de différentes stratégies de traitement employées pour les tumeurs osseuses.

L'auteur aborde ensuite une étude bibliographique d'un concept thérapeutique original en oncologie qu'est l'hyperthermie.

Suit l'exposé de l'étude expérimentale conduite dans le cadre de cette thèse, où la technologie de la microscopie électronique à transmission a par exemple été employée pour identifier les mécanismes de capture des nanoparticules par les cellules osseuses.

La conclusion met en évidence toute la subtilité de cette approche thérapeutique et les champs d'investigation qu'elle ouvre.

MOTS-CLES : nanoparticules, mouton, fémur, hyperthermie

ENGLISH TITLE : Study of the diffusion of ferromagnetic nanoparticles in the sheep femur.

Application to the treatment of osseous tumours.

ABSTRACT :

Hyperthermia is a tool for treatment of osseous tumours of recent development, where ferromagnetic particles are subjected to an alternate magnetic field warm up at temperatures about 50°C and destroy the cells being in their immediate environment.

This strategy is potentially useful against to the osseous tumours. The aim of this work is to elucidate the mechanisms of tissue and cellular sequestration of the nanoparticles which start to be understood, as clinical applications should be considered.

In the first part, the author makes some recalls targeted on epidemiology, the clinical, diagnostic and therapeutic aspects of the skeletal tumours of the domestic carnivores.

He underlines the insufficiency and the many side effects of various strategies of treatment employed for the osseous tumours. Then the author presents a bibliographical study of an original therapeutic concept in oncology which is hyperthermia.

The talk of the experimental study led in this thesis follows, where the technology of electronic microscopy with transmission for example was employed to identify the mechanisms of capture of the nanoparticles by the osseous cells.

The conclusion highlights all the subtlety of this therapeutic approach and the fields of investigation which it opens.

KEY WORDS : nanoparticules, sheep, femur, hyperthermia

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	:	M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	:	M.	R. FLORIO
		M.	J. FERNEY
		M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	:	M.	A. BRIZARD
		M.	L. FALIU
		M.	C. LABIE
		M.	C. PAVAUX
		M.	F. LESCURE
		M.	A. RICO
		M.	A. CAZIEUX
		Mme	V. BURGAT
		M.	D. GRIESS
		M.	J. CHANTAL
		M.	J.-F. GUELF

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mme **CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du bétail*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la reproduction*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
N. **DESMAIZIERES Louis-Marie**, *Clinique équine*
M. **LEON Olivier**, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

- M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*



A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE,

Monsieur le Professeur Paul BONNEVIALLE

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Chirurgie orthopédique et traumatologique

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THÈSE,

Monsieur le Docteur Didier MATHON

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Chirurgicale

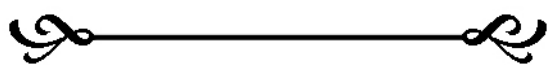
Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail,
Pour son aide précieuse et qui m'a permis de réaliser ce travail,
Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur André AUTEFAGE

Professeur de l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse

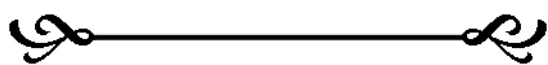
Pathologie Chirurgicale

Qui nous a fait l'honneur de juger ce travail et de faire partie de notre jury de thèse,
Qu'il soit assuré de notre respect et notre reconnaissance.



Au Docteur Patrick Frayssinet

Qui nous a fait l'honneur de nous confier cette étude
Merci pour votre aide tout au long de ce travail



A mes parents, M-Helena et Daniel,

Je ne serais pas là aujourd'hui sans votre amour, votre confiance et votre soutien de tous les instants.

Trouvez ici le témoignage de mon respect, de ma confiance et de mon amour.

A Elisa,

Ma Chtite sœur, pour notre complicité sans cesse croissante...merci pour ton soutien...et ta présence tout simplement.

A Elvira, Carlos, Silvio et Tania,

Souvent trop loin, mais toujours chères à mon coeur.

A Olivier,

A cette amitié infaillible, à tous nos moments privilégiés, nos écarts de conduite...
A bientôt sur Lille.

A Martin,

En souvenir des années montpelliéraines et toulousaines, de ces longues parties de billard...

A Julien, Yann et Alexis,

En souvenir des longues soirées estivales, espérant qu'il y en aura d'autres.

A Maria,

En souvenir des moments passés et à venir. Merci de m'avoir soutenu pendant cette période. Merci pour ton amour, tes pensées quotidiennes qui me remontent le moral.

A ceux qu'il m'a fallu supporter chaque jour, mais qui ont le mérite d'avoir fait de même.

Table des Matières

Table des Figures	16
Introduction	18
I. Traitement des tumeurs squelettiques chez l'animal et chez l'homme	20
1.1/ Aspects biologiques et épidémiologiques	20
1.1.1/ Au sein de l'espèce canine	20
1.1.2/ Au sein de l'espèce féline	23
1.1.3/ Chez l'homme	24
1.2/ Clinique et Diagnostic	25
1.2.1/ Clinique	25
1.2.2/ Imagerie médicale	26
1.2.2.1/ Radiographies des os	26
1.2.2.2/ Radiographies pulmonaires	29
1.2.2.3/ Scintigraphie osseuse	30
1.2.2.4/ L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	32
1.2.3/ Examens cytologique et histologique	33
1.2.3.1/ Analyse cytologique : cytoponction à l'aiguille fine	33
1.2.3.2/ Analyse histologique : la biopsie	34
1.2.4/ Examens hémato-biochimiques	35
1.3/ Traitement	36
1.3.1/ Traitement chirurgical	36
1.3.1.1/ L'amputation	36
1.3.1.2/ Traitement conservateur	37
1.3.2/ Traitement médical	40
1.3.2.1/ Chimiothérapie	40
1.3.2.1.1/ Définition – Généralités	40
1.3.2.1.2/ Principe	40
1.3.2.1.3/ Applications cliniques	42
1.3.2.2/ Immunothérapie	45
1.3.2.2.1/ Définition – Généralités	43
1.3.2.2.2/ Principe et méthodes	46
1.3.2.2.2.1/ Immunothérapie passive	46
1.3.2.2.2.2/ Immunothérapie active	47
1.3.2.2.2.2.1/ Immunothérapie active non spécifique	47
1.3.2.2.2.2.2/ Immunothérapie active spécifique	48
1.3.2.2.2.3/ Thérapie génique	49

1.3.3/ Traitement physique	50
1.3.3.1/ Radiothérapie	50
1.3.3.1.1/ Définition – Généralités	50
1.3.3.1.2/ Principe	50
1.3.3.1.3/ Méthodes	52
1.3.3.1.3.1/ Téléthérapie	52
1.3.3.1.3.1.1/ Orthovoltage	52
1.3.3.1.3.1.2/ Caesium 137 radioactif	52
1.3.3.1.3.1.3/ Cobalt 60 radioactif	53
1.3.3.1.3.1.4/ Accélérateur linéaire	53
1.3.3.1.3.2/ Curiethérapie	53
1.3.3.1.4/ Applications cliniques	55
1.3.3.2/ Hyperthermie	56
1.3.3.2.1/ Définition – Généralités	56
1.3.3.2.2/ Principe et méthodes	56
1.3.3.2.2.1/ Effets biologiques de l'hyperthermie	57
1.3.3.2.2.1.1/ A l'échelle tissulaire	57
1.3.3.2.2.2.1/ A l'échelle cellulaire	59
1.3.3.2.2.3/ A l'échelle moléculaire	60
1.3.3.2.2.2/ Méthodes	61
1.3.3.2.2.2.1/ Ondes électromagnétiques	61
1.3.3.2.2.2.1.1/ Radiofréquences	61
1.3.3.2.2.2.1.2/ Micro –ondes	62
1.3.3.2.2.2.2/ Ultrasons	62

II. L'utilisation des nanoparticules dans le traitement des tumeurs **64**

2.1/ Propriétés physico-chimiques des nanoparticules ferromagnétiques	65
2.2/ Propriétés magnétiques des nanoparticules ferromagnétiques	66
2.2.1/ Principaux types de comportements magnétiques des nanoparticules	67
2.2.1.1/ Le diamagnétisme	67
2.2.1.2/ Le paramagnétisme	67
2.2.1.3/ Le ferromagnétisme	67
2.2.1.4/ Le superparamagnétisme	69
2.2.2/ Notion d'hystérésis	69
2.3/ Utilisation en tant que transporteurs moléculaires	71
2.3.1/ Principe	71
2.3.2/ Essais cliniques	72
2.4/ Utilisation en tant que générateurs d'énergie thermique	73
2.4.1/ Généralités – principe	74
2.4.2/ Mécanismes – méthodes	74
2.4.3/ Essais cliniques	77

III. Etude expérimentale	79
3.1/ But de l'expérimentation	79
3.2/ Protocole expérimental	80
3.2.1/ Matériel	80
3.2.1.1/ Les animaux.	80
3.2.1.2/ Les chambres en titane	80
3.2.1.3/ Les nanoparticules de fer	81
3.2.2/ Méthodes	82
3.2.2.1/ L'implantation animale	82
3.2.2.2/ Le suivi et obtention du matériel à analyser	83
3.2.2.3/ Etude histologique	84
3.2.2.4/ Microscopie électronique à transmission	84
3.3/ Résultats	85
3.3.1/ Histologie du contenu des chambres	85
3.3.1.1/ Microscopie optique	85
3.3.1.2/ Microscopie électronique	86
3.3.1.2.1/ Particules de 500 nm	86
3.3.1.2.2/ Particules de 150 nm	87
3.3.1.2.3/ Particules de 70 nm	88
3.3.2/ Histologie des nœuds lymphatiques	89
3.3.1.1/ Microscopie optique	89
3.3.1.2/ Microscopie électronique	90
3.4/ Discussion	92
Conclusion	96
Bibliographie	98

Table des Figures

Fig. n°	Titre :	Page
1	Topographie et fréquence de 154 ostéosarcomes appendiculaires chez les chiens de grand format (d'après 31).	21
2	Topographie de 22 ostéosarcomes chez le chat (d'après 15).	23
3	Illustration des principaux paramètres radiologiques à analyser (d'après 68)	27
4	Radiographies (profil et face) d'un Labrador de 10 ans présentant un ostéosarcome situé à l'extrémité distale du radius-ulna (ENVV).	28
5	Radiographies (profil et face) d'un chat européen âgé de 15 ans présentant un ostéosarcome de l'extrémité proximale de l'humérus G. Noter la lyse sévère (ENVV).	28
6	Examen scintigraphique sur un beagle (d'après 7).	31
7	Image par scintigraphie d'un chien présentant un ostéosarcome. Hyperfixation au niveau du grasset (flèches), pas de métastases visibles (d'après 7)	31
8	Illustration des pièges de la biopsie osseuse (d'après 68).	35
9	Courbes de survie (Kaplan-Meier) des chiens souffrant d'ostéosarcome en fonction des modalités du traitement (d'après 8,65,82).	38
10	Radiographie du membre opéré, avec une allogreffe et l'arthrodèse du carpe (d'après 82).	38
11	Schéma représentant le spectre des ondes électromagnétiques	51
12	Sources radioactives utilisables dans le cadre de la curiethérapie (d'après 27).	53
13	Représentation schématique de la cinétique d'échauffement d'un tissu biologique pour une énergie thermogène fournie : variations de la température en un point donné d'un volume cible, en fonction du temps t pour différents ordres de grandeur du flux sanguin FS supposé constant (d'après 36).	58
14	Courbes de survie cellulaire en fonction du temps d'exposition (d'après 27)	59
15	Récapitulatif des dispositifs utilisables dans l'application de traitements thermiques	63
16	Illustration hypothétique de la réponse magnétique de nanoparticules se trouvant dans un vaisseau allant du nanomètre au micromètre, dans le cas de matériel diamagnétique (DM), paramagnétique (PM), ferromagnétique (FM) selon que le nombre de domaines qui composent la particule et pour nanoparticules superparamagnétiques (SPM) (d'après 75).	69
17	Mécanismes de relaxation de nanoparticules magnétiques (d'après 11).	70
18	Représentation schématique d'un transport de molécules dans un site précis. Un cathéter est placé sur un vaisseau irriguant le site et un champ magnétique est appliqué (d'après 75).	71
19	Représentation d'un complexe nanoparticule magnétique-molécule de chimiothérapie	71
20	Essai clinique sur des lapins montrant l'échauffement préférentiel de la tumeur lors de l'injection de nanoparticules ferromagnétiques. Représentation des courbes de température au cours du traitement selon la localisation (d'après 75).	74

Fig. n°	Titre :	Page
21	Prototype du système permettant l'application d'hyperthermie (MFH Hyperthermie système GmbH, Berlin, Allemagne). Le champ magnétique produit est perpendiculaire à l'axe du patient (1). Il s'agit d'un noyau de ferrite (2) délivrant un champ magnétique de fréquence 100kHz et intensité réglable de 0 à 15 kAm-1, le système est refroidi par air (4). L'ouverture (3), la température et d'autres paramètres sont surveillés et réglés par un opérateur devant l'unité centrale (5). La température est mesurée de manière invasive par une méthode fluoroptique à plusieurs endroits (6) (d'après 51).	78
22	Schéma d'une chambre de titane et de son tunnel dans lequel pénètre le tissu de cicatrisation	81
23	Chambre en titane entièrement démontée sur laquelle on peut observer le tunnel creusé dans la partie amovible	81
24	1 Etapes de la mise en place d'une chambre en titane dans le condyle fémoral latéral d'une brebis. 2	82 83
25	Section du contenu d'une chambre de culture remplie de particules (70 nm). De nombreuses cellules contiennent des particules sans marquer une activité phosphatase acide alors que d'autres ayant une activité phosphatase acide en contiennent.	85
26	Section du contenu d'une chambre contenant des nanoparticules de 70 nm. Il existe des cellules contenant des particules visibles sous forme de dépôts noirs ainsi que des cellules positives (bleu-gris) à la réaction de Perls et ne contenant pas d'amas visibles en microscopie optique	85
27	a : microscopie électronique à transmission du contenu de chambre en titane contenant des particules de 500 nm. Elles peuvent être isolées ou bien agglomérées dans les mêmes vésicules. b : la densité de particules diminue en dehors de certaines zones particulières.	86
28	MET d'un lysosome contenant des particules de 500 nm montrant des particules se corrodant. Des particules de dégradation sont visibles en périphérie	87
29	La répartition des particules de 150 nm dans les cellules est assez homogène. De nombreuses cellules contiennent les particules à distance de l'insertion des particules, ici à proximité d'un capillaire	87
30	Les particules sont présentes dans les lysosomes sous forme de petits amas ou bien sous forme d'agrégats très importants dans des phagosomes	88
31	Il y a des cellules multinuclées au contact d'agrégats de particules (70 nm) de plusieurs dizaines de µm. L'agrégat est dissocié par les cellules qui internalisent les nanoparticules sous leur forme primaire. Elles contiennent des microagrégats dans leur lysosomes	88
32	A l'intérieur des cellules, les nanoparticules sont stockées dans des vésicules (endosomes, lysosomes ou phagolysosomes).	89
33	a/ Particules de 150 nm visualisées dans un ganglion poplité b/ Cellules contenant du fer sous forme ferrique dans un ganglion identique	89
34	MET de particules de 500 nm dans un ganglion lombo-aortique	90
35	MET de particules de 150 nm dans les ganglions	90
36	MET de particules de 70 nm observées dans un lysosome de macrophage de nœud lymphatique. Les nanoparticules présentent une surface irrégulière, modifiée et certaines ont fusionné.	91
37	MET de particules de 70 nm observées dans une vacuole d'un lymphocyte situé dans un NL et présentent des signes de dégradation.	91

Introduction :

Le choix du sujet, tout comme des limites et des objectifs assignés à cette étude découlent directement des préoccupations rencontrées en oncologie humaine et vétérinaire.

Les tumeurs musculo-squelettiques, plus particulièrement l'ostéosarcome appendiculaire de par son importance, sont des affections extrêmement sévères qui justifient la mise en œuvre de thérapies très lourdes. Alors que ce n'est plus le cas en médecine humaine, en effet en 2002 60 à 80 % des enfants et adolescents pris en charge dans des services spécialisés survivent en première rémission complète avec un membre fonctionnel au prix d'un traitement long et coûteux ^(24,29), en médecine vétérinaire, le pronostic reste réservé.

C'est dans un souci de prolonger la vie des malades que les recherches sont poursuivies quant aux différents choix thérapeutiques que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Plus récemment un intérêt accru a été porté à de nouvelles thérapeutiques comme l'immunothérapie, la thérapie génique et l'hyperthermie.

L'hyperthermie provoquée représente l'action d'un agent physique simple dans son principe dont l'utilisation remonte à 5000 ans ⁽⁴⁶⁾. Elle fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches étant donné le potentiel théorique dans la lutte contre le cancer. En effet les cellules malignes seraient plus sensibles à élévation de température que les cellules normales, cette caractéristique est en accord avec le principe de toute thérapie anticancéreuse : la destruction des cellules malignes en portant le moins de préjudice possible aux cellules saines.

Parallèlement le développement des nanotechnologies permet aujourd'hui la mise au point de nanoparticules métalliques et donc d'un nouveau dispositif d'application de l'hyperthermie. Ce nouveau dispositif s'appuie sur la capacité des nanoparticules métalliques à produire de l'énergie thermique lorsque elles se trouvent dans un champ magnétique variable généré par un courant alternatif. Une fois ces nanoparticules dans le tissu tumoral l'échauffement de ce dernier serait possible et donc le traitement de la tumeur.

Il s'agit donc d'un concept très prometteur mais dont les applications cliniques nécessitent au préalable la résolution de certaines inconnues. Ainsi lors d'applications locales des nanoparticules, comment va s'effectuer la biodistribution de celles-ci ? A quelle vitesse ? Dans quelles cellules va-t-on les trouver préférentiellement ?

Afin de définir le contexte et les intérêts d'une telle étude nous récapitulerons dans une première partie les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques actuelles des tumeurs squelettiques. Puis dans une seconde partie nous traiterons l'étendue des applications des nanoparticules métalliques dans la thérapeutique anticancéreuse. Enfin nous exposerons l'expérimentation menée au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse en collaboration avec URODELIA – St Lys afin d'étudier la pénétration intracellulaire des nanoparticules métalliques dans les cellules osseuses.

1/ Traitement des tumeurs squelettiques chez l'animal et chez l'homme

Les tumeurs squelettiques peuvent être primaires ou métastatiques, d'origine épithéliale ou mésenchymateuse. Les tumeurs primaires de l'os, sont le plus souvent malignes comme l'ostéosarcome, le chondrosarcome, le fibrosarcome et l'hémangiosarcome. Il existe des tumeurs osseuses bénignes comme l'ostéome, le chondrome, ces dernières étant plus rares.

Les tumeurs osseuses affectent toutes les espèces domestiques ainsi que l'homme, à des degrés variables ⁽⁸⁵⁾. Néanmoins de par les caractéristiques économiques de leurs productions, les ruminants et les équidés ne sont pas ou peu concernés par la thérapeutique de ce type de tumeurs. Les seuls bénéficiaires des études menées sur ce sujet sont l'homme et les carnivores domestiques.

Dans ce chapitre nous évoquerons d'abord l'épidémiologie, des éléments de biologie puis les aspects cliniques des tumeurs squelettiques des mammifères supérieurs en général. Nous nous attarderons ensuite sur les différents choix thérapeutiques possibles pour le traitement de ces tumeurs squelettiques.

1.1/ Aspects biologiques et épidémiologiques

1.1.1/ Au sein de l'espèce canine

Les tumeurs squelettiques sont relativement peu fréquentes chez le chien, représentant 5 % des tumeurs diagnostiquées. Elles sont le plus souvent malignes comme par exemple l'ostéosarcome qui à lui seul représente 80 à 90 % des tumeurs osseuses, le chondrosarcome moins de 10 % ainsi que le fibrosarcome et l'hémangiosarcome avec moins de 5 % des cas rapportés ^(25,28,30,3,68).

Tous les sarcomes squelettiques expriment une malignité locale avec une ostéolyse pouvant conduire à la fracture spontanée. Il n'en est pas de même pour la malignité systémique, l'essaimage métastatique étant variable selon le type tumoral. Pour les chondrosarcomes et les fibrosarcomes, dont le potentiel métastatique est faible et tardif, une exérèse chirurgicale précoce pourrait être curative. Il n'en est pas de même pour l'ostéosarcome et

l'hémangiosarcome qui ont un fort potentiel métastatique. Les métastases vont intéresser les poumons, d'autres organes (cœur, foie,...) et les nœuds lymphatiques uniquement dans 10 % des cas pour l'ostéosarcome ^(25,73). Étant donnée la fréquence élevée de l'ostéosarcome par rapport aux autres tumeurs squelettiques, nous nous limiterons à la description de celui-ci, l'ostéosarcome appendiculaire étant le prototype canin.

La fréquence de ce dernier est proportionnelle à la taille, au poids ⁽⁸⁵⁾. L'ostéosarcome se rencontre préférentiellement chez les grandes races et les races géantes (Dogue Allemand, Irish Wolfhound, Saint Bernard, Rottweiller). Plus généralement le risque est plus élevé pour les grandes races et leurs croisements (races à fort potentiel de croissance), ces animaux ont 150 fois plus de probabilité de développer un ostéosarcome qu'un chien d'un poids inférieur à 10 kg ^(26,68,74).

Les animaux atteints sont adultes à âgés, l'âge moyen est évalué à 7-8 ans et des extrêmes allant de 6 mois à 13 ans ^(26,30,31), cependant un autre pic de fréquence est suggéré sur des animaux jeunes (2 ans) ^(26,28).

Une prédisposition sexuelle en défaveur des mâles est aujourd'hui réfutée ⁽²⁶⁾.

Les sites métaphysaires de développement les plus fréquents sont (Cf. fig. n° 1) :

- le radius distal
- l'humérus proximal
- le fémur distal
- le tibia proximal
- le tibia distal

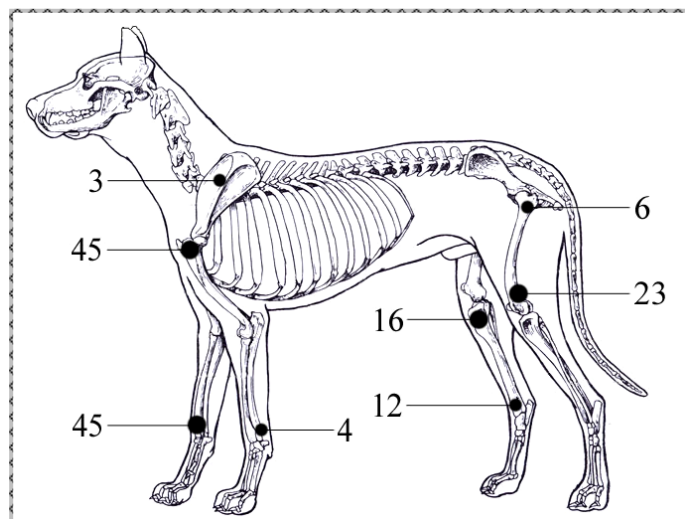


Figure n° 1 : Topographie et fréquence de 154 ostéosarcomes appendiculaires chez les chiens de grand format (d'après 31).

On se souviendra de leur localisation métaphysaire "loin du coude et près du genou", l'ostéosarcome primaire n'affecte que rarement le carpe et le tarse ⁽²¹⁾.

A l'inverse, chez les chiens de petit format (<15 kg), l'ostéosarcome ne représente que 43% des tumeurs osseuses, l'âge moyen d'apparition est de 10 ans et leur localisation est principalement axiale (mandibule, maxillaire, cavités nasales, crâne et rachis) et lorsqu'il touche les membres, c'est le fémur et le tibia qui sont le plus fréquemment touchés. Par ailleurs le chondrosarcome et le fibrosarcome sont mieux représentés ^(22,25).

Malgré une étiologie inconnue plusieurs facteurs favorisants sont mis en cause. Ces facteurs sont incriminés sur leur capacité à induire un turn-over cellulaire supérieur à la normale et donc d'augmenter les possibilités de mutations lors des divisions cellulaires ^(26,31). Les zones subissant des contraintes d'ordre mécanique comme des microtraumatismes, les fractures avec ou sans implants métalliques, lors de prothèse totale de hanche, sont autant de sites susceptibles de développer une tumeur après de longs délais évalués à 5 ans et plus ^(28,31). Dans le cas de tumeurs primitives osseuses associées à une ancienne fracture, leur localisation est souvent diaphysaire (suivant répartition des fractures).

L'ostéosarcome peut aussi survenir sur des zones irradiées lors de radiothérapie, généralement 1,7 à 5 ans après l'irradiation et lors d'un traitement supérieur à 3,5 Gy et cela dans moins de 5 % des cas ^(21,26,28).

Une prédisposition génétique existerait chez les grandes races et les races géantes, de même que chez le Rottweiler et le Saint-Bernard ^(28,74).

Au niveau moléculaire, des anomalies du gène suppresseur de tumeur p53 et du rétinoblastome sont régulièrement décelées, comme des mutations ponctuelles dans environ 40 % des ostéosarcomes canins ^(21,26,31). Des études évaluent le rôle de l'hormone de croissance (IGF-1) et de son récepteur (IGF-1R) ainsi que le facteur hépatique (HGF) et son récepteur (c-met) dans l'ostéosarcome canin, ces facteurs pourraient contribuer au phénotype malin ^(21,26).

L'ostéosarcome canin est une entité pathologique majeure chez les grandes races, dont les caractéristiques biologiques et épidémiologiques sont similaires à celles de l'ostéosarcome humain, ce qui fait de cette entité un excellent modèle d'étude de l'ostéosarcome humain.

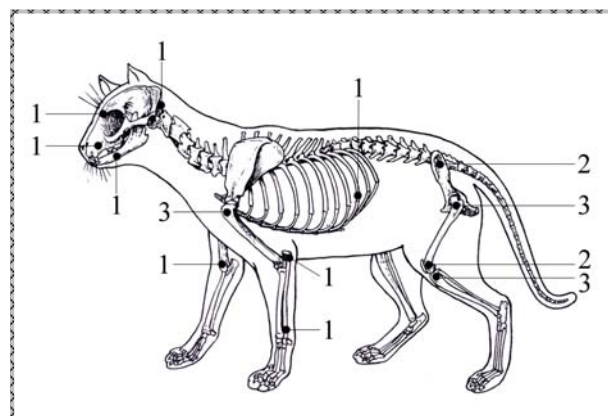
1.1.2/ Au sein de l'espèce féline

Les tumeurs osseuses primaires sont peu communes chez le chat avec seulement 5 % des tumeurs félines ⁽¹⁵⁾. L'ostéosarcome est la tumeur osseuse la plus fréquente chez le chat avec 70 % des cas. Elles affectent les chats plutôt âgés, la moyenne d'âge étant de 10 ans. On ne note pas de prédisposition sexuelle ni topographique. Ce dernier point étant sujet à controverses, des études montrent en effet une incidence supérieure sur les membres par rapport au squelette axial ^(15,24).

Une électivité topographique bien que non absolue, existe avec une fréquence supérieure sur les membres postérieurs, sur (Cf. fig. n° 2) :

- la métaphyse distale du fémur
- la métaphyse proximale du tibia.

Figure n° 2 : Topographie de 22 ostéosarcomes chez le chat (d'après 15).



Les tumeurs osseuses chez le chat sont généralement localisées sur les métaphyses des os longs et n'affectent que rarement l'articulation adjacente.

Le comportement tumoral, différent de celui rencontré chez le chien, est moins agressif, avec un pouvoir métastatique inférieur, des métastases étant décelées dans 16 % des cas de l'étude de Bitetto ⁽¹⁵⁾.

Le pronostic est favorable au long terme après un diagnostic précoce et le traitement chirurgical. L'amputation est en général le traitement de choix pour l'ostéosarcome appendiculaire du chat et peut s'avérer curative. Elle s'accompagne d'une excellente qualité de vie post-opératoire, une espérance de vie moyenne de 24 à 44 mois et la chimiothérapie n'est pas indiquée ^(26,31). Néanmoins une localisation axiale est d'un pronostic plus sombre de par les difficultés que représente une exérèse chirurgicale complète. La chimiothérapie est alors indiquée ⁽²⁶⁾.

1.1.3/ Chez l'homme

L'ostéosarcome constitue la tumeur la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes avec environ 40 % des sarcomes osseux et une prévalence estimée à 1/million/an.

S'exprimant préférentiellement chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes (5 à 25 ans, moyenne 17 ans), il représente 5 % des cancers de l'enfant en 1998. L'incidence n'est pas la même dans toutes les populations, ainsi l'incidence est moins élevée dans les populations asiatique et latino-américaine. Une prédominance masculine est évidente ^(24,29).

Les sites atteints sont proches des épiphyses "fertiles", ses sites métaphysaires sont le fémur distal (45 %), le tibia proximal (25 %) et l'humérus proximal. Le genou regroupe ainsi plus de 70 % des ostéosarcomes primaires.

L'étiologie, tout comme chez l'animal, est inconnue. Des facteurs de risque existent, comme les microtraumatismes osseux. L'incidence est ainsi plus élevée chez les sportifs. On peut aussi souligner sa survenue élective chez les enfants de grande taille (facteur déjà rencontré chez le chien dont l'ostéosarcome représente un modèle typique de la maladie humaine).

Chez l'adulte ce sont généralement des ostéosarcomes secondaires sur des individus porteurs de la maladie de Paget, de dysplasie fibreuse ou consécutivement à une radiothérapie ⁽²⁹⁾.

1.2/ Clinique et diagnostic

Le diagnostic de tumeur osseuse va s'appuyer sur l'épidémiologie (signalement de l'animal), l'anamnèse et l'examen clinique et radiographique. L'ensemble des données obtenues est généralement suffisant pour établir un diagnostic dans la plupart des cas.

1.2.1/ Clinique

Les signes physiques observés, sont fonction du site de la tumeur et indépendants de sa nature osseuse primitive ou métastatique.

Lors d'atteinte du squelette appendiculaire, le principal signe clinique est une boiterie, évolutive sur plusieurs semaines à plusieurs mois. Initialement intermittente puis permanente, elle est due à la douleur occasionnée par l'appui du membre et l'inflammation tissulaire locale. Cette boiterie qui apparaît de manière progressive peut être aiguë lors d'une fracture pathologique. Ce signe, chez un chien de grande taille, doit conduire à une exploration complète afin de ne pas retarder un diagnostic de cancer au fort pouvoir métastatique. Secondairement, une déformation du profil osseux peut survenir. Celle-ci est toujours douloureuse à la palpation pression et s'accompagne éventuellement d'œdème ou d'une plaie de léchage. Selon la durée d'évolution de la boiterie, une amyotrophie variable s'installe. Dans certains cas les lésions osseuses peuvent causer une fracture spontanée lors d'un traumatisme minime.

Lors d'atteinte des os plats et courts, les signes exprimés sont variables, déformation du profil osseux (crâne, mandibule,...), boiteries (scapula, bassin,...), douleur accompagnée ou non de signes de compression médullaire (parésie, paralysie) lors d'atteinte vertébrale.

1.2.2/ Imagerie médicale

1.2.2.1/ Radiographie des os

Cet examen complémentaire portera sur le site suspect, avec deux incidences orthogonales, il permettra l'analyse de la lésion osseuse. L'apparence radiographique de l'ostéosarcome est variable, cependant quelques lésions élémentaires sont à rechercher. Tout d'abord la radiographie va permettre ^(21,26,28,30,31,68) (Cf. fig. n° 3) :

- de localiser la lésion : épiphysaire, métaphysaire ou diaphysaire. Les tumeurs primitives osseuses affectent presque exclusivement la métaphyse des os longs, un seul os est généralement atteint (lésion monostotique). Lorsque l'atteinte est multiple (lésion polyostotique) et de siège diaphysaire, cela évoquera des métastases.
- d'analyser la réaction de l'os : ostéolyse qui va se traduire par une diminution de l'opacité du tissu osseux en contraste avec le tissu normal avoisinant et pouvant aller jusqu'à la lyse des corticales. Elle se traduit sous forme de lacune à contours flous ou nets, rehaussés ou non de condensation périphérique. On distingue 2 grands types d'ostéolyse : géographique (à bords nets), de type mité (ou ponctué, lacunes variablement confluentes). L'ostéoproduction ou ostéocondensation peut être d'origine périostée ou endostée, mais aussi s'opérer dans l'os spongieux ou l'os sous-chondral.
- d'analyser la réaction périostée : la réaction périostée peut revêtir plusieurs aspects de grande valeur sémiologique. En réponse à un processus bénin ou lent, elle est bien organisée, lisse et régulière. Lors de processus pathologique agressif, la réaction périostée est généralement irrégulière, lamellaire lors de lésion débutante, souvent spiculée lors d'évolution rapide. La formation d'un éperon limité par le périoste décollé et la corticale (triangle de Codman) marque une tumeur très agressive.
- d'analyser l'étendue des lésions : il s'agit d'évaluer la transition entre la lésion et l'os sain. Elle est graduelle lors d'une progression rapide de la lésion, indiquant que le processus est mal circonscrit. Dans le cas d'une lésion bénigne ou peu agressive, cette transition se fait brutalement.

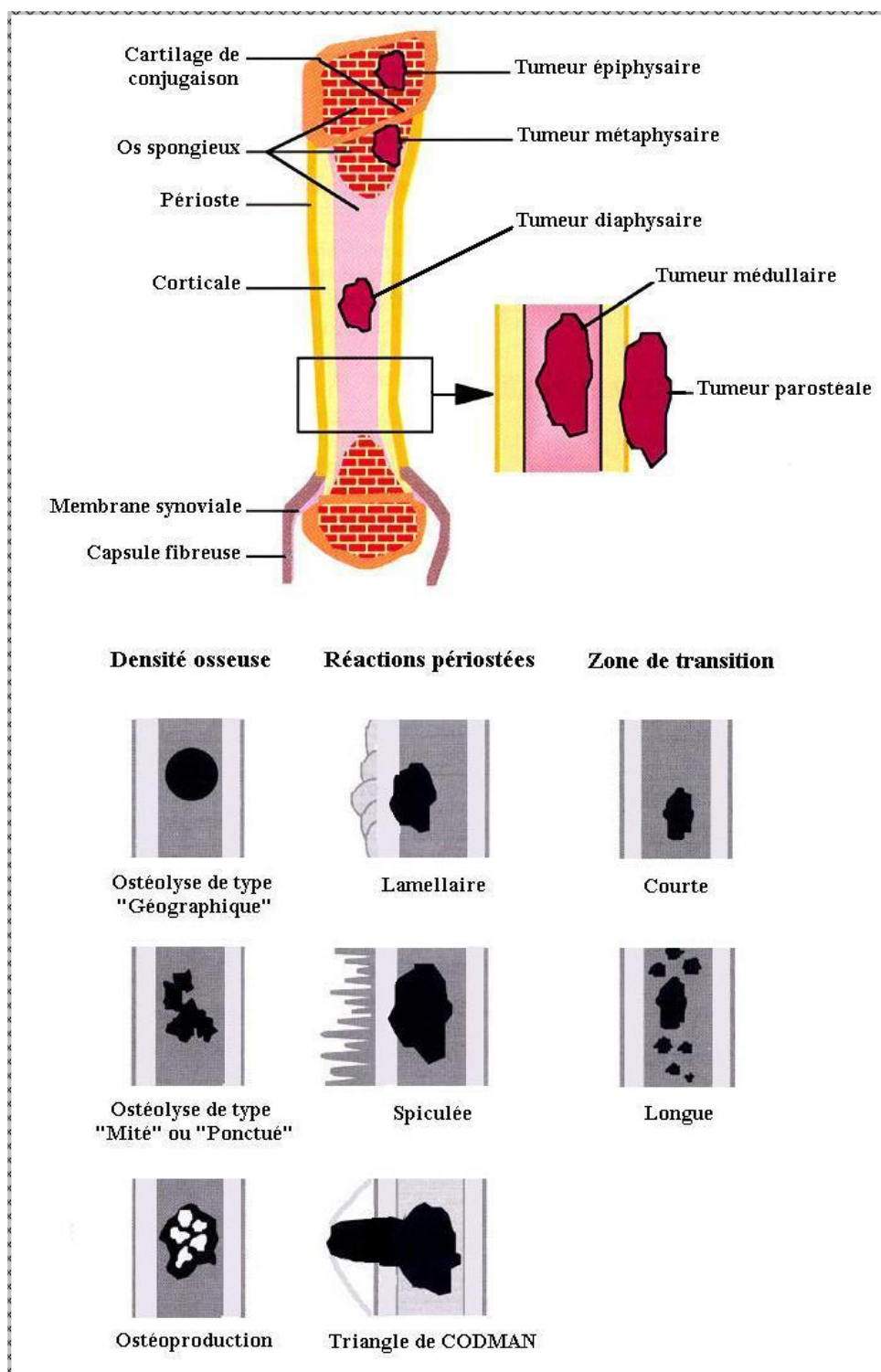


Figure n° 3 : Illustration des principaux paramètres radiologiques à analyser (d'après 68).

La distribution des lésions, les variations de densité osseuse (prolifération et destruction osseuse) et la délimitation de la lésion (zone de transition) sont autant de données permettant de déterminer l'agressivité de la lésion et l'orientation diagnostique (Cf. fig. n° 4-5).



Figure n° 4 : Radiographies (profil et face) d'un Labrador de 10 ans présentant un ostéosarcome situé à l'extrémité distale du radiu-ulna (ENVT).

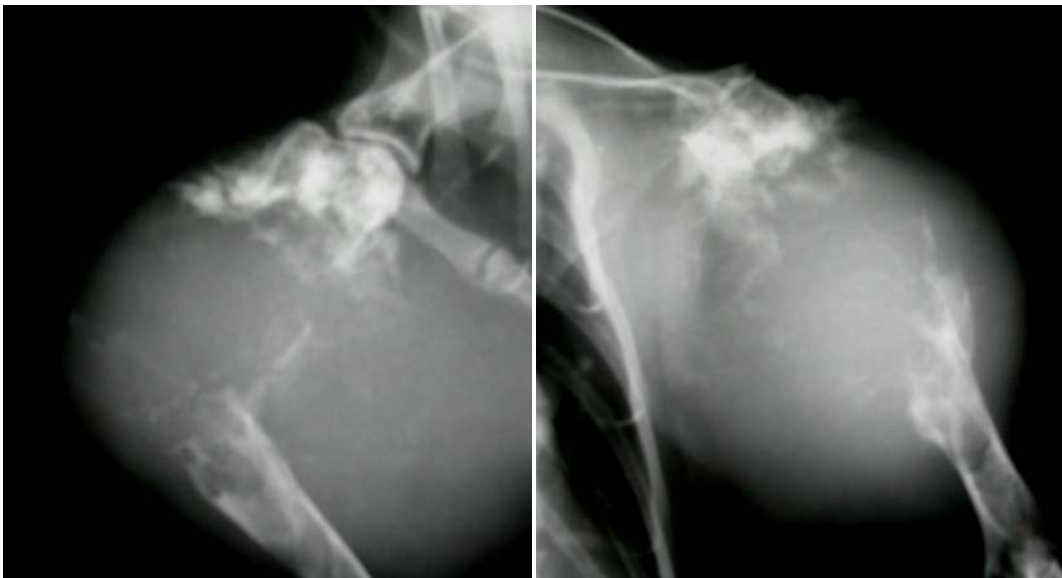


Figure n° 5 : Radiographies (profil et face) d'un chat européen âgé de 15 ans présentant un ostéosarcome de l'extrémité proximale de l'humérus G. Noter la lyse sévère (ENVT).

Néanmoins ce type de lésions n'est pas pathognomonique, ces images radiographiques pouvant se retrouver individuellement ou associées lors d'affections de gravité moindre dont

la principale est l'ostéomyélite d'origine bactériologique ou fongique, métastase ou autre tumeur primaire ou secondaire ^(21,24).

Un examen méthodique avec des clichés radiographiques de qualité confrontés au contexte épidémiologique, topographique autoriseront un diagnostic et orientera vers un type histologique donné.

1.2.2.2/ Radiographies pulmonaires

Cet examen fait partie du bilan d'extension qui doit être entrepris avant d'envisager un traitement. Compte tenu du pouvoir métastatique élevé et précoce de certains sarcomes osseux (ostéosarcome et hémangiosarcome) qui empruntent généralement la voie hématogène, les métastases seront systématiques ⁽⁶⁸⁾.

Afin d'optimiser le seuil de détectabilité les deux profils seront complétés par une incidence ventro-dorsale, la sensibilité est alors évaluée à 97-100 %, elle étant de 95 % pour les deux profils ⁽⁴⁷⁾.

Lors d'ostéosarcome (sarcome osseux le plus fréquent, cf. infra), le taux de métastases décelables radiologiquement ne dépasse pas 10 % alors que 98 % en possèdent déjà au moment du diagnostic ⁽³¹⁾. Ce taux de détection s'élèvera à près de 100 % au cours des mois qui suivent. Lorsque les métastases sont visibles, elles sont multiples, de radiodensité variable et situées en périphérie des champs pulmonaires ⁽⁶⁸⁾.

L'absence d'images métastatiques au moment du diagnostic n'exclut pas l'existence de micrométastases occultes dont la taille se situe en dessous du seuil de détectabilité (6 à 8 mm) ^(21,68). On fera attention aux erreurs par défaut, en effet dans certaines localisations (récessus costo-phréniques) des nodules sous pleuraux d'un diamètre supérieur à 1 cm peuvent être méconnus. Mais aussi aux erreurs par excès, comme des superpositions (mamelles, néoformation cutanée), lésions non tumorales (abcès) ou coupe de vaisseaux pulmonaires ⁽⁸⁴⁾.

C'est donc un examen complémentaire rapide, peu cher, non invasif et de bonne résolution spatiale, mais où le contraste tissu sain/tissu tumoral est moindre. C'est ainsi que la radiographie peut-être accompagnée d'une échographie, de meilleure résolution pour les tissus mous qui permet d'explorer une infiltration de ces derniers ⁽⁷⁴⁾. Cependant la sensibilité est fonction de l'utilisateur.

1.2.2.3/ La scintigraphie osseuse

Il s'agit de l'imagerie médicale nucléaire la plus couramment utilisée en médecine vétérinaire ^(7,64). Les images obtenues lors de la scintigraphie osseuse sont issues d'un mécanisme complexe. Elle utilise des produits émetteurs de rayons γ , ce sont des radionucléides à demi-vie courte comme le technétium 99 (^{99}Tc) associés à des molécules spécifiques de l'organe à explorer. Pour le tissu osseux, on utilise le méthylène diphosphonate ($\text{MDP-}^{99}\text{mTc}$) qui va se fixer sur l'hydroxyapatite 3 h après l'injection permettant de visualiser le squelette entier. La quantité fixée sera fonction du flux sanguin et du turn-over cellulaire, on parle alors d'hyperfixation ou hypofixation. Un compteur de scintillations ou une caméra sensible aux rayons γ est utilisé pour enregistrer les rayons émis par le patient et produire une image via un ordinateur (Cf. fig. n° 6).

Plus précisément l'examen scintigraphique du squelette peut-être divisé en trois phases :

- Phase I ou phase vasculaire : immédiatement après l'injection intra veineuse, elle met en évidence les vaisseaux sanguins de gros diamètre, confère à la scintigraphie une sensibilité importante en ce qui concerne la détection de défauts d'irrigation (ischémie, infarctus,...) et des processus inflammatoires. Cette phase permet donc d'évaluer la composante vasculaire.
- Phase II : 2 à 20 minutes après l'injection, les images obtenues représentent la biodistribution des radionucléides dans l'espace extracellulaire des tissus. Elle permet de détecter les processus inflammatoires aigus touchant les tissus mous qui entourent le squelette (tendinites, synovites, myosites,...)
- Phase III : 2 à 3 heures après l'injection. Les radionucléides se sont fixés sur l'hydroxyapatite et vont permettre de détecter et d'évaluer un processus aigu ou chronique causant un turn-over cellulaire accru (fractures, arthrose, ostéomyélite, réactions périostées et tumeurs osseuses primaires ou métastatiques)

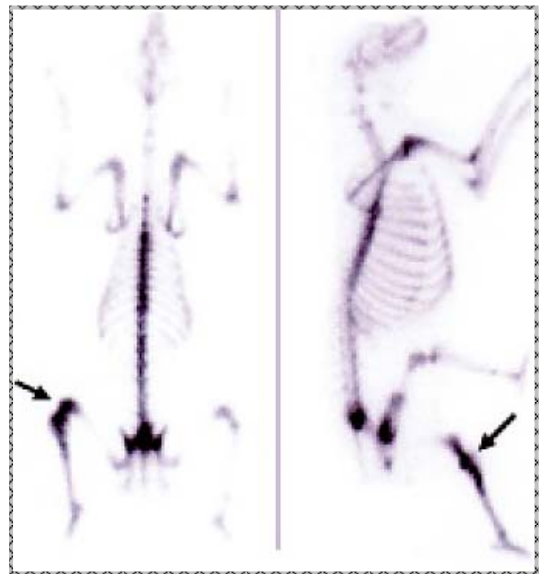
On remarquera que très souvent les deux premières phases ne sont pas analysées en médecine vétérinaire.



Figure n° 6: Examen scintigraphique sur un beagle (d'après 7).

La scintigraphie permet en premier lieu de déterminer avec exactitude le bilan d'extension locale (Cf. fig. n° 7), elle est plus sensible que la radiographie et ne sous-estime les limites réelles de la tumeur que dans 5 % des cas contre 60 % des cas pour la radiographie (23,64).

Figure n° 7: Image par scintigraphie d'un chien présentant un ostéosarcome. Hyperfixation au niveau du grasset (flèches), pas de métastases visibles (d'après 7).



Le second intérêt apparaît lors du bilan d'extension régional et à distance, mettant en évidence les zones où il y a une activité ostéogène intense que ce soit des métastases osseuses, plus rarement des métastases ganglionnaires. Peuvent aussi être considérées comme suspectes les images traduisant une zone d'hypoactivité, plus rares et caractéristiques de lésions très ostéolytiques.

C'est une technique plus sensible que la radiographie pour détecter aussi bien les tumeurs primaires que les secondaires et les métastases ou extensions tumorales non encore radiovisibles. Cependant peu spécifique, les foyers hyperfixants pouvant être des foyers inflammatoires, d'arthrose, ou lors de trauma, il n'y a donc pas de différence entre un

processus bénin ou tumoral. On fera donc attention dans le cas où cet examen est envisagé de le faire avant la biopsie osseuse pour éviter les artéfacts liés à l'hémorragie, à l'œdème et à la reconstruction osseuse associées.

En médecine humaine où cet examen est plus systématique, d'autres technologies lui sont associées comme la possibilité de reconstruire les images obtenues en trois dimensions. L'utilisation d'autres molécules est aussi exploitée comme le thallium (^{201}Tl), le méthoxyisobutylisonitrile ou MIBI qui permettent d'évaluer la vitalité cellulaire et le fluorodésoxyglucose marqué (^{18}F -FDG) qui permet d'apprécier la consommation de glucose par augmentation de la glycolyse en conditions pathologiques⁽²⁹⁾.

La scintigraphie est donc recommandée si le choix thérapeutique se porte sur un traitement conservateur ou une appréciation précise des limites tumorales est nécessaire pour une résection complète.

1.2.2.4/ L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

La constitution de l'image IRM repose sur l'interaction d'un champ magnétique et d'une radiofréquence sur l'orientation des atomes d'hydrogènes (protons) constituant l'organisme. L'aimant permet d'orienter tous les protons dans une même direction. Ceux-ci sont ensuite écartés de cette direction grâce à l'énergie donnée par une radiofréquence générée par une antenne. L'émission de l'antenne s'interrompant, les protons reprennent leur position d'équilibre dans le champ magnétique (relaxation) en restituant de l'énergie qui peut être lue par une même antenne. L'énergie redistribuée peut être décomposée suivant un axe parallèle au champ magnétique (relaxation longitudinale ou T1) ou un axe perpendiculaire au champ magnétique (relaxation transversale ou T2). Les relaxations T1 et T2 des protons dépendent des tissus, ceci permet d'obtenir deux images de contraste différent des différents tissus. Ces images sont appelées images pondérées T1 et T2.

Bien que deux visions différentes d'une même structure soient possibles, il peut là encore être intéressant d'utiliser des produits de contraste. Le gadolinium a une biodistribution identique aux contrastes iodés hydrosolubles utilisés en radiologie. On peut donc l'utiliser dans les mêmes conditions en sachant qu'il entraînera une hyperdensité sur les images pondérées en T1 lorsque la structure fixera ce contraste.

En IRM, il n'existe pas d'échelle de densité et on parle d'hyper ou d'hypointensité en T1 ou en T2 en fonction de l'aspect d'un tissu quelconque par rapport aux tissus adjacents. Alors qu'il s'agit d'un examen quasi systématique en médecine humaine il reste exceptionnel en médecine vétérinaire française. Il permet ^(23,29):

- Un examen morphologique de la tumeur et des structures adjacentes.
- Préciser la topographie de la lésion par rapport aux interlignes articulaires et aux cartilages de conjugaison.
- Explorer l'envahissement des tissus mous.
- La mensuration tridimensionnelle de la lésion qui permet de déterminer un risque métastatique à partir d'un volume de 150 cm³.

De plus cet examen doit être réalisé avant la biopsie pour les raisons évoquées précédemment et peut être relayé par la tomodensitométrie pour les os plats et les os de morphologie complexe.

1.2.3/ Examens cytologique et histologique

1.2.3.1/ Analyse cytologique : cytoponction à l'aiguille fine

Son intérêt est généralement considéré comme limité dans le diagnostic et le bilan d'extension des tumeurs osseuses primaires (ostéosarcome) de par la nature calcifiée des tissus. Des résultats récents permettent de penser le contraire. L'étude menée par Stockhaus et al sur des cytologies réalisées par aspiration à l'aiguille fine, puis confrontées à l'histologie sur biopsie, a démontré que la cytologie a permis d'évaluer correctement la malignité dans 72 % des cas (33 cas) et l'identification du type tumoral dans 57 % des cas ⁽⁸¹⁾. D'autres études mettent en garde sur la représentativité des cellules obtenues par biopsie, indiquant que plus de 50 % des patients sur lesquels un diagnostic d'ostéome ou tumeur autre que l'ostéosarcome s'avèrent être des ostéosarcomes (analyse histologique sur pièce d'exérèse) ⁽³¹⁾.

Dans le cas où elle est réalisée, au moins 2 cytoponctions doivent être réalisées préférentiellement au centre de la lésion ⁽⁸¹⁾.

Dans le cadre du bilan d'extension loco-régional, la cytoponction des nœuds lymphatiques hypertrophiés peut être effectuée bien que n'étant pas un site de métastases habituel ⁽³¹⁾.

1.2.3.2/ Analyse histologique : la biopsie

L'analyse histologique sera toujours effectuée sur la pièce d'exérèse. Cependant dans le cas de diagnostic de certitude, lors d'un tableau clinique équivoque ou lorsque une chirurgie conservatrice est envisagée, elle sera effectuée en préopératoire. On a recours à la biopsie osseuse.

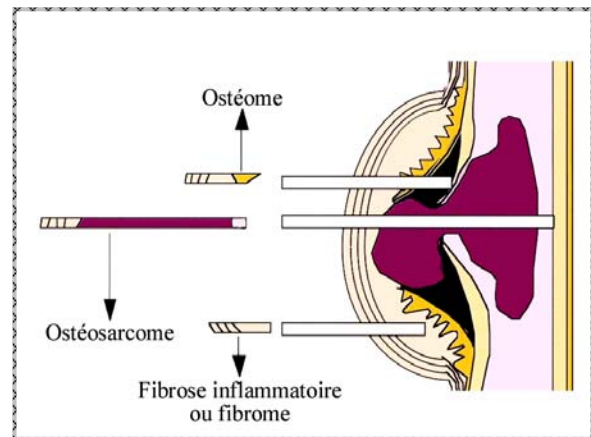
Celle-ci requiert une anesthésie générale ou une sédation et anesthésie locale, elle est réalisée à l'aide d'une tréphine de Michèle, une aiguille de Jamshidi ou encore un trocart de Mazabraud. La tréphine de Michèle sera utilisée sur des os longs avec des lésions importantes munie d'un moteur ou manuellement. Cette dernière méthode sera préférée de par le gain de sensations de la densité osseuse, de plus l'utilisation d'un moteur va créer localement un échauffement et va détruire les tissus.

Contrairement aux conseils que l'on peut trouver dans la littérature concernant le site de biopsie, il semble que l'on ait plus de chances d'effectuer une biopsie diagnostique si elle est pratiquée au centre de la lésion (83,9 % des cas) que dans la zone de transition tissu sain/tissu tumoral (54,5 % des cas). Si l'on biopsie deux sites, les chances de diagnostic s'élèvent à 92 % ⁽⁸⁷⁾.

De tels taux de réussite ne sont valables que si les règles qui codifient cet acte chirurgical sont respectées. L'instrument utilisé doit buter contre la corticale opposée à celle atteinte par le processus tumoral voir l'inclure. (Cf. fig. n° 8).

La réalisation d'une biopsie trop superficielle peut conduire le pathologiste à conclure à un ostéome ou à une fibrose inflammatoire, car ce type de réaction tissulaire se développe au voisinage immédiat du processus tumoral. Le risque de fracture est minime lors de biopsies même multiples si une seule corticale est prélevée.

Figure n° 8 : Illustration des pièges de la biopsie osseuse (d'après 68).



La biopsie osseuse est donc l'unique examen permettant un diagnostic de certitude mais cet acte chirurgical doit suivre les règles établies afin d'obtenir le résultat escompté.

1.2.4/ Examens hémato-biochimiques

Les analyses hématologiques et biochimiques ont initialement peu d'intérêt. Peuvent être notées de modifications hématologiques comme une anémie, thrombocytopénie, neutrophilie, éosinophilie et CIVD.

Au niveau biochimique, l'attention est portée sur le taux de phosphatases alcalines qui est augmenté chez les chiens atteints d'un ostéosarcome primaire. Un taux de phosphatases alcalines élevé est associé à un pronostic plus réservé, plus précisément un taux préopératoire de phosphatases alcalines totale ou de l'isoenzyme osseuse est associé à une durée sans récurrence et une survie plus courtes ⁽²¹⁾. Plus récemment, une étude envisage leur utilisation dans le bilan d'extension. Ce n'est cependant pas un examen de routine ⁽²⁶⁾.

Une hyper ou hypocalcémie peut traduire un syndrome paranéoplasique, non spécifique de l'ostéosarcome ou d'autres tumeurs primaires, lorsque les métastases se situent sur des tissus mous.

Ce ne sont pas des examens utilisés au quotidien dans l'exploration des tumeurs osseuses, mais qui trouvent leur intérêt dans la perspective d'un traitement adjuvant comme la chimiothérapie. Cette dernière pouvant s'avérer toxique pour la fonction rénale, cardiaque ou pour la moelle osseuse.

1.3/ Traitement

Nous allons aborder successivement les différents choix thérapeutiques envisageables dans le traitement des tumeurs musculo-squelettiques. Nous commencerons par le traitement le plus important en fréquence de par son efficacité et sa simplicité, l'exérèse chirurgicale. Cette dernière peut s'inscrire dans plusieurs choix thérapeutiques (amputation, traitement conservateur) mais elle intervient aussi dans le diagnostic (Cf. supra). Son indication dans le traitement des métastases pulmonaires reste ponctuelle. Nous décrirons ensuite les traitements médicaux (chimiothérapie et immunothérapie) puis les traitements physiques (radiothérapie et l'hyperthermie).

1.3.1/ Traitement chirurgical

Dans le cadre des tumeurs musculo-squelettiques du chien, plus précisément l'ostéosarcome canin appendiculaire, la chirurgie a pour but de retirer la tumeur primaire, voire les métastases.

Le choix de la technique à mettre en œuvre dépend de plusieurs facteurs : l'animal, sa clinique, le bilan d'extension, les choix du propriétaire, les compétences et les ressources techniques du vétérinaire.

1.3.1.1/ L'amputation

Il s'agit du traitement mis en œuvre le plus souvent et c'était le traitement de choix jusqu'au milieu des années 90. Cela peut s'expliquer par le faible coût, des techniques simples et un taux de complications très faible ^(26,31,80).

De plus, elle est généralement bien tolérée par les chiens et leur propriétaire, d'autant plus que les animaux traités retrouvent une qualité de vie excellente en 1 à 4 semaines ⁽⁵⁸⁾.

Des études sur l'adaptation des chiens ayant subi une amputation montrent qu'elle est plus rapide lors d'amputation d'un membre postérieur ^(28,58).

L'amputation a pour fin l'exérèse totale de la tumeur primaire.

Nous n'aborderons pas ici les techniques d'amputation, cependant nous énumérerons les sites conseillés selon la localisation tumorale ^(21,26,30,31,80).

Au niveau des membres antérieurs, une amputation complète est conseillée évitant ainsi les risques liés à une récurrence d'une tumeur du radius proximal. Une scapulectomie partielle (exérèse des deux tiers maximum) est envisageable lors de tumeurs de la scapula proximale.

Au niveau des membres postérieurs, l'amputation peut s'effectuer par ostéotomie au niveau du tiers proximal du fémur ou par désarticulation coxo-fémorale. Lors de tumeurs de la région proximale du fémur ou de l'hémibassin le traitement préconisé est une hémipelvectomie vu le risque de récurrence locale ^(26,31).

L'espérance de vie suite à ce type de traitement est de 5 mois en moyenne et le taux de survie à 1 et 2 ans est de 11,5 et 2 %. Cette durée de vie pouvant être jugée courte s'accompagne d'une qualité de vie excellente. Cela est dû aux répercussions tardives des métastases sur l'état général ⁽⁸⁰⁾.

Ce type de traitement est donc palliatif, de même chez l'homme où le taux de survie à 5 ans est de 20 % des patients atteints d'un ostéosarcome traités chirurgicalement uniquement ⁽²⁹⁾.

1.3.1.2/ Traitement conservateur

Certains chiens ne peuvent pas être traités par amputation, de par leur taille trop importante, leur poids excessif, à cause d'un problème neurologique affectant leur capacité à marcher après l'amputation. Certains propriétaires refusent l'idée de voir leur animal amputé. Dans certaines cas, des techniques complexes peuvent être mises en œuvre afin de préserver le membre pour des raisons fonctionnelles ou esthétiques ^(25,26,31,65,82).

Le principe de telles techniques est une résection de la tumeur avec des marges saines, et son remplacement par une allogreffe d'os (os cortical). Cette procédure fait l'objet de plus en plus d'études et sa mise en place ne s'effectue que dans des circonstances bien précises ^(25,21,25,31,65). Pour des raisons techniques les "meilleurs" candidats sont ceux dont la tumeur se situe en zone distale du radius ou de l'ulna sans atteindre plus de 50 % de la longueur de l'os (au-delà la fixation de l'implant est difficile) ⁽⁸²⁾.

Ce type de chirurgie est précédée d'un traitement médical et/ou physique (chimiothérapie, radiothérapie de 30 à 40 Gy) afin de réduire l'étendue de la lésion et donc diminuer le stade clinique. L'exérèse du segment atteint est ainsi plus aisée. Le segment retiré, il est remplacé par une allogreffe d'os cortical de banque. Cet allogreffe a subi un traitement chimique ou physique afin d'éliminer son immunogénicité. L'allogreffe corticale peut être remplie de ciment de type polyméthylmétacrylate afin d'augmenter sa résistance ⁽⁶⁹⁾ et la prise du matériel d'ostéosynthèse ⁽²⁶⁾.

La fixation de l'allogreffe est effectuée par la pose d'une plaque vissée type DCP pontant la greffe. Une pseudoarthrodèse du carpe est ainsi effectuée par plaque vissée (Cf. fig. n° 10) Pendant le traitement chirurgical et suite à celui-ci une chimiothérapie est mise en place.

L'intérêt de telles techniques reste encore discutable et ne doit pas être considéré comme le traitement de choix. Il n'y a pas de différence significative entre les taux de survie des chiens traités par amputation et administration de cisplatine (Cf. infra) et les chiens ayant subi un traitement conservateur et reçu de la cisplatine (Cf. fig. n° 9).

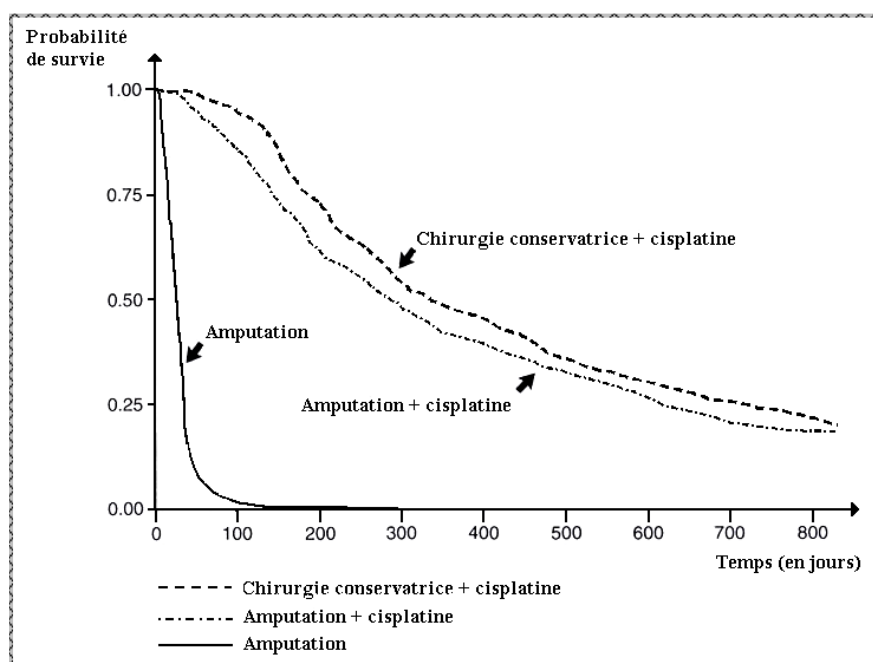
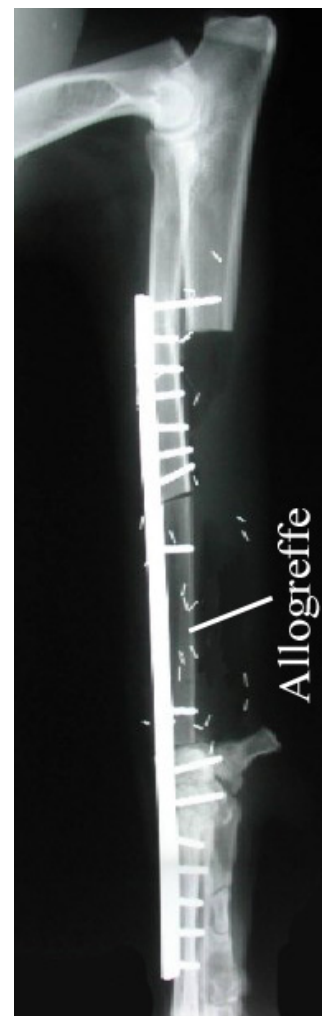


Figure n° 9: Courbes de survie (Kaplan-Meier) des chiens souffrant d'ostéosarcome en fonction des modalités du traitement (d'après 8,65,82).

Figure n° 10 : radio du membre opéré, avec une allogreffe et l'arthrodèse du carpe (d'après 82).



Bien que la fonction du membre soit conservée et satisfaisante dans 80 % des cas ⁽²⁶⁾, cette procédure n'est pas envisageable en routine en chirurgie vétérinaire. En effet l'approvisionnement en os de banque et les conditions chirurgicales nécessitent la mise en œuvre de moyens techniques et financiers importants (\pm 5000 €).

De plus les complications sont plus nombreuses et parfois importantes comme les ostéomyélites (40 à 50 %), les récurrences locales (20 à 30 %) ruptures d'implants ou vis et les métastases pulmonaires ^(21,25,26,82). Ces dernières pouvant être traitées par résection. Cependant l'étude d'O'Brien menée sur 36 chiens ayant été traités pour ostéosarcome appendiculaire par amputation ou traitement conservateur montre que la métastasectomie est réalisable mais n'apporte qu'une courte espérance de vie ^(21,26).

Il s'agit donc d'une technique amenée à se développer, mais nécessitant une implication importante du clinicien, de son équipe et du propriétaire de l'animal.

1.3.2/ Traitement médical

1.3.2.1/ Chimiothérapie

1.3.2.1.1/ Définition – Généralités

Thérapie anti-cancéreuse basée sur l'utilisation de produits chimiques, de médicaments extraits de végétaux ou produits en laboratoire. Ces produits ont une action toxique sur les cellules cancéreuses mais aussi sur les cellules normales d'où les effets secondaires parfois importants nécessitant l'arrêt du traitement.

1.3.2.1.2/ Principe

La chimiothérapie anti-cancéreuse a commencé dans les années 1940 avec l'utilisation de la moutarde à l'azote (chlorméthine) et des antagonistes de l'acide folique (methotrexate). Elle va connaître un essor important au cours des décennies suivantes, grâce à la découverte de nouvelles molécules et à une meilleure utilisation. Ces molécules sont cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, quelque soit le mode d'action. Ceci est cependant à nuancer car cette cytotoxicité varie d'un type tumoral à l'autre. Le mode d'action est spécifique à chaque famille de produits, ils vont empêcher le bon déroulement du cycle cellulaire, et par conséquence la division cellulaire.

On distingue :

- les agents alkylants ou mécanismes apparentés :

Par formation de liaisons covalentes entre ces molécules et les bases azotées (alkylation) composant l'ADN, empêchent ainsi toute transcription ou duplication. Ce sont des agents cycle dépendants. Le principal représentant de cette famille est le cyclophosphamide (ENDOXAN ND, Baxter – Division Oncology, Maurepas), avec le chlorambucil (CHLORAMINOPHENE ND, Techni-Pharma, Monaco), l'ifosfamide (HOLOXAN ND,

Baxter – Division Oncology, Maurepas), la cisplatine (CISPLATYL ND, Aventis, Paris), le melphalan (ALKERAN ND, GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi).

- les anti-métabolites :

Ce sont des analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques, ils vont donc être utilisés par la cellule comme tels, cependant ils vont bloquer la cellule, interférant donc avec le métabolisme de l'ADN. Ce sont des agents phase S dépendants. on retrouve dans cette famille le 5 fluorouracil (FLUORO-URACILE ND, Dakota Pharm, Le Plessis-Robinson), le methotrexate (METHOTREXATE BELLON ND, Aventis, Paris), l'azathioprine (IMUREL ND, GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi), la cytarabine (ARACYTINE ND, Pharmacia SAS, Guyancourt).

- les alcaloïdes mitostatiques :

Ou antimitotiques *stricto sensu*, ce sont les poisons du fuseau, ils vont inhiber la polymérisation de la tubuline et empêcher le bon déroulement de la mitose. Ce sont donc des agents phase M dépendants dont le principal représentant est la vincristine (ONCOVIN ND, EuroGenerics, Boulogne-Billancourt) et la vinblastine (VELBE ND, EuroGenerics, Boulogne-Billancourt).

- les antibiotiques anti-tumoraux :

Ou agents interkalants, ils vont s'insérer entre les bases azotées, bloquant ainsi la topoisomérase II, protéine fonctionnelle. Ce sont des agents cycle dépendants, dont le chef de file est l'adriamycine (ADRIBLASTINE ND, Pharmacia SAS, Guyancourt), ses analogues comme l'epirubicine (FARMORUBICINE ND, Pfizer, Paris), le mitoxantrone (NOVANTRONE ND, Wyeth-Lederlé, Paris).

- les agents scindants :

Capables de rompre les molécules d'ADN. Ce sont des agents cycle dépendants, représentés par les bléomycines (BLEOMYCINE BELLON ND, Aventis, Paris).

- les corticoïdes :

Anti-inflammatoires stéroïdiens qui vont se lier à l'ADN et altérer la transcription en ARN.

- divers :

La L-asparaginase (KIDROLASE ND, Aventis, Paris), enzyme protéolytique transformant l'asparagine sérique en acide aspartique, aboutissant à une carence en L-asparagine et une baisse des synthèses protéiques.

La mort cellulaire induite par ces produits concerne donc toutes les cellules en division, donc les cellules saines sont aussi affectées, ce qui est à l'origine de la toxicité. La place de la chimiothérapie dans le traitement d'un cancer dépend de son type et de son étendue. On distingue la chimiothérapie curative qui a pour objectif la guérison du patient que l'on peut classer en chimiothérapie première curative dont les indications sont restreintes (hématosarcomes et mastocytomes) et la chimiothérapie adjuvante qui précède et/ou suit une chirurgie ou une radiothérapie. Cette dernière permet de prévenir l'évolution à distance de tumeurs à pouvoir métastatique (tumeurs mammaires, sarcomes agressifs (hémangiosarcomes...), tumeurs thyroïdiennes et les tumeurs osseuses primitives) et dans certains cas de réduire le volume de la tumeur primitive. Enfin on peut aussi discerner la chimiothérapie palliative, qui n'a pas pour but de guérir la maladie mais simplement d'améliorer les conditions de vie et parfois d'allonger la survie.

1.3.2.1.3/ Applications cliniques

La chimiothérapie est donc conseillée aux patients avec des tumeurs ayant métastasé ou à distribution multifocale quand un traitement local (chirurgical, radiothérapie) n'est pas envisageable. Son utilisation doit prendre en compte plusieurs facteurs : la sensibilité du type tumoral aux molécules qui vont être utilisées, le gain de qualité de vie. Pour ce dernier facteur, il faut mesurer les avantages liés à la chimiothérapie et ces inconvénients comme la toxicité.

En médecine vétérinaire, étant donné les caractéristiques des tumeurs osseuses chez le chien, lors du diagnostic d'un ostéosarcome, des métastases non radio-visibles sont présentes chez 80 à 90 % des patients ⁽³¹⁾. Une forme de thérapie adjuvante est nécessaire si on veut améliorer l'espérance de vie.

La chimiothérapie est l'un des traitements adjuvants les plus fréquents lors du traitement de l'ostéosarcome chez le chien. Celui-ci ayant le même comportement chez l'homme que chez le chien ⁽⁹⁾, les modalités de ce type de traitement découlent de celui utilisé chez l'homme. Chez ce dernier, les molécules les plus utilisées sont la cisplatine, la doxorubicine et le methotrexate. Cette liste est plus restreinte chez les carnivores domestiques. La cisplatine est la molécule de choix chez le chien ^(31,62,82), de nombreux essais ont été effectués avec la doxorubicine par analogie avec l'homme ⁽⁹⁾.

Cependant les buts de la chimiothérapie chez l'animal et chez l'homme ne sont pas identiques, chez ce dernier le facteur décisif étant l'espérance de vie.

Ainsi en médecine humaine, l'utilisation d'une seule molécule est rare car considérée comme n'ayant pas une efficacité suffisante ⁽²⁹⁾.

En médecine vétérinaire, de nouveaux protocoles parfois complexes sont mis au point mais l'utilisation d'une seule molécule se justifie par le besoin d'établir l'efficacité de celle-ci avant de l'inclure dans un protocole.

De plus, des études vétérinaires démontrent qu'un protocole mono-molécule est aussi efficace qu'un multi-molécules.

Ainsi dans le traitement par chimiothérapie de l'ostéosarcome canin, le protocole de choix reste un mono protocole à base de cisplatine malgré son importante néphrotoxicité. Son administration s'effectue en perfusion intraveineuse à la posologie de 60-70 mg/m² avec une diurèse forcée afin de limiter sa toxicité, 2-3 semaines après la chirurgie (amputation).

Des études rétrospectives permettent de chiffrer cette augmentation de l'espérance de vie, bien que variable à l'image des protocoles (nombre d'administrations, posologie), l'espérance de vie atteint 1 an.

Kraegel SA et al l'ont évaluée à 413 jours avec un taux de survie à 1 an de 62 %, le protocole étant de 6 administrations de cisplatine à 50 mg/m² à intervalles de 4 semaines ou jusqu'à ce que des métastases soient décelées ⁽⁶²⁾.

Straw RC et Withrow SJ ont obtenu des résultats similaires, et ont montré que la différence d'espérance de vie selon que l'administration de cisplatine ait commencé en pré-opératoire ou uniquement après le traitement chirurgical n'était pas significative ⁽⁸³⁾.

La doxorubicine (ADRIBLASTINE ND, Pharmacia SAS, Guyancourt) utilisée en médecine humaine et vétérinaire dans le cadre de traitements d'autres tumeurs a fait l'objet de plusieurs études ⁽⁹⁾, cependant les résultats obtenus lors de 5 administrations à intervalles de 2 semaines à la dose de 30 mg/m² sont comparables à ceux obtenus avec la cisplatine, à savoir une espérance de vie moyenne de 52,8 semaines et un taux de survie à 1 et 2 ans de 50,5 et 9,7 % respectivement.

La carboplatine (PARAPLATINE ND, Bristol-Myers Squibb, Rueil-Malmaison) est aussi utilisée, c'est un analogue de la cisplatine, dont les avantages sont une néphrotoxicité moindre ne nécessitant pas une diurèse forcée pendant l'administration.

Lors d'une étude rétrospective sur 48 chiens atteints d'un ostéosarcome appendiculaire traités par amputation puis par l'administration de carboplatine, Bergman a démontré une durée de vie sans métastases de 257 jours et une espérance de vie moyenne de 321 jours⁽¹⁰⁾.

La chimiothérapie permet donc de longues périodes de rémission avec une qualité de vie tout à fait confortable mais elle est rarement curative. Etant donné son image en médecine humaine, son utilisation en clientèle vétérinaire passe par un dialogue avec le propriétaire, afin de lui expliquer ce que l'on veut faire, ce que l'on peut espérer, et à quel coût.

Il faut aussi informer que ce n'est pas un traitement sans innocuité, il existe une toxicité qui est fonction des molécules utilisées, de la dose ainsi que de la tolérance de l'animal.

L'échec doit aussi être envisagé, d'autant plus que des phénomènes de chimiorésistance sont décrits^(28,73,74).

Plusieurs mécanismes de résistance peuvent être suspectés : congénitale (ou naturelle) ou acquise. Dans ce cas la tumeur qui est initialement sensible à la chimiothérapie devient progressivement résistante ou entre en rémission et lors de la rechute n'est plus sensible à la molécule précédemment utilisée. Plusieurs mécanismes d'induction de cette résistance sont décrits, ils dépendent de plusieurs facteurs^(27,73,74):

- Hétérogénéité tumorale et sélection par la chimiothérapie de clones naturellement résistants
- Instabilité génétique des tumeurs : les mutations spontanées, les translocations de gènes, spontanées ou induites par la chimiothérapie sont fréquentes
- Amplification de gènes : correspond à une augmentation de l'expression d'un gène par le biais de la multiplication du génome ; ceci peut induire l'apparition de chromosomes supplémentaires " les minutes double chromosomes".

On peut ainsi citer quelques exemples de chimiorésistance connus :

- Augmentation de l'activité de l'enzyme cible : le 5FU, inhibiteur de thymidilate synthétase entraîne une augmentation considérable du taux de cette enzyme dans la cellule par le biais d'une amplification génique
- Diminution de l'affinité de l'enzyme cible. Certains antimétabolites nécessitent leur activation dans la cellule (AraC). On peut assister à une diminution des mécanismes d'activation de la drogue

- Augmentation de l'activité d'une voie enzymatique accessoire : la cellule active une voie métabolique accessoire qui lui permet de contourner l'étape inhibée par l'autre métabolite
- Augmentation de l'inactivation intracellulaire de la drogue (alkylants). Ils sont inactivés par des groupements thiols (-SH) sur lesquels se fixent les radicaux actifs des alkylants. L'augmentation des taux intracellulaires de la glutathion synthétase et des glutathions transférases entraîne l'inactivation des alkylants.
- Augmentation de la réparation des lésions induites par augmentation de synthèse d'enzymes de réparation
- MDRI = Multi Drug Résistance = résistance pléiotro-pique caractérisée par l'apparition d'une résistance croisée à certaines drogues telles :
 - les anthracyclines
 - les anthracines diones
 - les alcaloïdes de la pervenche
 - les dérivés de l'épipodophyllotoxine
 - l'actinomycine D
 - les taxanes

Cette résistance est imputable à l'apparition puis l'augmentation de l'expression d'une glycoprotéine membranaire : la Gp 170, transporteur membranaire qui sert à l'excrétion des drogues hors de la cellule.

1.3.2.2/ Immunothérapie

1.3.2.2.1/ Définition – Généralités

Il s'agit d'une technique basée sur la capacité du système immunitaire à reconnaître et à détruire les éléments cellulaires reconnus comme du non soi, dans ce cadre il s'agit des cellules tumorales. L'immunité anti-tumorale intéresse principalement l'immunité cellulaire, avec l'intervention des lymphocytes T (LT) dont l'importance n'est pas clairement définie, les lymphocytes Natural Killer (L NK) dont la portée systémique permet de lutter contre les métastases. Leur action a été démontrée *in vitro*. Ils sont capables de lyser des tumeurs. Les macrophages qui ont un rôle important dans la présentation des antigènes (Ag) vont aussi

faciliter la croissance tumorale par la production de cytokines immunosuppressives comme les prostaglandines E2 ^(73,74).

Les méthodes ou agents utilisés vont agir soit sur les effecteurs du système immunitaire lui-même, soit sur la tumeur ou encore son environnement. Ceci afin d'obtenir des antigènes tumoraux, une inhibition des facteurs immunosuppresseurs le cas échéant ou une activation des cellules effectrices. Donc le développement de stratégies peut s'appuyer sur chacun de ces mécanismes.

1.3.2.2/ Principe et méthodes

Dès la fin du XIX siècle, un traitement basé sur le système immunitaire est tenté avec des applications sans succès durable. C'est pendant ces trente dernières années, avec l'isolement des substances produites au cours d'une réaction immunitaire (cytokines) et la compréhension de leurs relations avec les effecteurs du système immunitaire que se sont développées des stratégies thérapeutiques suivies d'essais cliniques.

1.3.2.2.1/ Immunothérapie passive

La plus ancienne, elle cherchait à apporter au malade des anticorps (Ac) dirigés contre les cellules cancéreuses. Les technologies et les applications sont diverses. Dans les années 1890, la production de tels Ac était obtenue par l'inoculation de broyats de tumeurs à des animaux (souris, chiens...), puis leur sérum est recueilli 15 jours plus tard pour l'injecter aux malades, avec peu de résultats ⁽⁷⁴⁾.

Les progrès techniques ont permis l'obtention de différents Ac ces vingt dernières années. Des souris sont immunisées avec les Ag appropriés permettant l'obtention des Ac. Ces Ac sont utilisés seuls ou en combinaison pour leurs effets cytotoxiques intrinsèques (activation du complément, agglutination) ou extrinsèques liés à des microparticules radioactives, produits de chimiothérapie, des toxines ou autres molécules toxiques.

Mais l'efficacité de cette thérapeutique est modulée par la capacité du système immunitaire de l'individu malade à réagir, par l'utilisation adjuvante d'interleukines comme IL2, TNF α ou des facteurs de croissance pour potentialiser les effets. De plus de nombreux facteurs peuvent influencer l'efficacité de tels traitements : l'importance de l'Ag (sa spécificité des cellules

cancéreuses), son expression, la taille de la tumeur et sa vascularisation, la clairance de l'Ag, la dose et la voie d'administration et le développement d'une réaction immunitaire contre ces Ac. Ce dernier problème a été contrôlé par l'utilisation d'Ac chimériques utilisant la région constante Fc ^(27,74).

Plus récemment a été exploré un autre type d'immunothérapie que l'on pourrait classer dans cette section, l'immunothérapie adoptive. Cette dernière consiste dans le transfert de lymphocytes T fonctionnels, naïfs ou immuns, à un animal d'expérience ou à un individu incapable de développer une réponse immune à l'égard de l'antigène concerné. Pour ce faire on peut utiliser des lymphocytes allogéniques ou autologues qui apportent leur spécificité de reconnaissance des antigènes à éliminer. A l'heure actuelle les résultats les plus encourageants ont été obtenus par Rosenberg qui a utilisé des Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) avec une réponse objective au traitement de 34% des malades ⁽⁷⁴⁾.

1.3.2.2.2/ Immunothérapie active

Il s'agit de stimuler les défenses immunitaires de l'individu pour l'aider à se débarrasser de la tumeur. Cette stimulation peut-être non spécifique ou spécifique.

1.3.2.2.2.1/ Immunothérapie active non spécifique

Elle s'appuie sur l'administration d'agents qui vont stimuler le système immunitaire en général. Depuis le XX^{ème} siècle, plusieurs substances ont été employées comme immunostimulants. Les premiers furent des bactéries viables ou des extraits bactériens. Plus récemment, le bacille de Calmette et Guérin (BCG), un bacille du genre mycobactérium atténué dont l'emploi a permis le traitement de carcinomes vésicaux chez l'homme, mais peu de succès chez le chien dans le traitement de tumeurs mammaires ou mélanomes. *Corynebacterium parvum* a démontré une activité anti-tumorale sur les mélanomes chez l'homme et le chien ⁽⁷⁴⁾.

- L-MTP-PE : il s'agit d'une molécule synthétique dérivée de la molécule lipophile, le muramyl dipeptide (MDP) qui est le peptidoglycane minimal de la membrane de certaines

bactéries dont mycobacterium. Cette molécule est active sur les macrophages et monocytes en favorisant leur croissance. L'encapsulation de cette molécule dans une vésicule multilamellaire a conduit au L-MTP-PE, utilisé dans diverses études et applications cliniques chez l'homme. Son activité anti-tumorale a été démontrée sur l'ostéosarcome, mélanome et carcinome rénal.

MacEwen et al ⁽⁶⁷⁾ l'ont évalué lors d'un essai de niveau III chez des chiens atteints d'un ostéosarcome appendiculaire. Sur 27 chiens, traités par amputation, 14 ont reçu du L-MTP-PE et 13 des liposomes vides. La durée moyenne sans récurrences fut de 168 et 58 jours, la durée moyenne de survie fut de 222 et 77 jours respectivement. Cette étude démontre clairement l'activité du L-MTP-PE dans la prévention de métastases.

Une autre étude a été menée sur le même type d'animaux, à savoir des chiens atteints d'un ostéosarcome appendiculaire sans métastases radiovisibles traités par amputation puis chimiothérapie (cisplatine à 70 mg/m², 4 fois à 28 jours d'intervalle). Un mois après la dernière injection de cisplatine, si des métastases n'étaient pas observées, le traitement au L-MTP-PE (2 mg/m²) était entrepris. Le placebo étant des liposomes remplis d'une solution de NaCl à 0,9%. La durée sans récurrences fut de 12 et 7,2 mois et la durée de vie moyenne de 14,6 et 10 mois respectivement. Ces deux études permettent de constater l'effet du L-MTP-PE sur les micrométastases et son action sur l'espérance de vie ⁽⁶⁷⁾.

- Le lévamisole, un phenylimidazole, isomère du tétramisole, il augmente la production de LT.
- IL2, produite par les LT auxiliaires, induit une prolifération accrue des LB, LT, monocytes et la cytotoxicité des LT NK.

1.3.2.2.2.2/ Immunothérapie active spécifique

Les agents utilisés vont stimuler le système immunitaire envers un type d'Ag tel un vaccin, cependant ce n'est pas aussi simple que les vaccins anti-viraux qui ont peu d'Ag. En effet le problème majeur est de trouver un Ag qui soit exprimé par toutes les cellules cancéreuses et non présent sur les cellules normales.

Face à ces difficultés, les tentatives de vaccination anti-tumorale se sont portées vers différentes formes d'antigènes ⁽⁷³⁾:

- Utilisation de cellules tumorales entières comme source d'antigène. Procédure simple apportant l'ensemble des antigènes et minimisant les risques d'échappement de variants n'exprimant pas certains épitopes.
- Apport de peptides immunogènes, dans ce cas il doit satisfaire deux conditions : être exprimé par la tumeur primitive et les métastases éventuelles et le patient doit posséder l'allèle HLA liant et présentant ce peptide.
- Apport de protéines entières. L'intérêt est de pouvoir générer des peptides multiples.
- Apport d'antigènes sous formes d'acides nucléiques.

L'immunothérapie ne s'est vue porter un intérêt certain et a connu un développement constant que depuis la compréhension des relations entre les différents effecteurs du système immunitaire et les cytokines produites par ces derniers. Les essais thérapeutiques se multipliant et intégrant les données issues de l'expérimentation animale. Mais déjà des questions se posent quant à son innocuité.

1.3.2.2.3/ La thérapie génique

Voie d'avenir dans le traitement des tumeurs, elle est définie comme l'insertion d'un gène fonctionnel dans des cellules afin de corriger une erreur génétique ou attribuer une nouvelle fonction à une cellule.

Plusieurs axes sont exploités ⁽⁷³⁾:

- protéger les cellules de la moelle osseuse par l'insertion d'un gène de multirésistance augmentant ainsi l'index thérapeutique de la chimiothérapie, permettant ainsi l'utilisation des molécules citées plus haut à dose plus élevée et donc un effet accru.
- restaurer le gène suppresseur tumoral p53 dans les cellules tumorales, où il est le plus fréquemment muté.
- modifier le métabolisme tumoral (altérer leur croissance, augmenter leur immunogénicité.
- inactiver les oncogènes par l'insertion de nucléotides anti-sens.
- augmenter la production d'interleukines comme IL2 par les lymphocytes infiltrant les tumeurs ou par les cellules tumorales elles-mêmes.

La thérapie génique pourra être utilisée en combinaison avec les autres modalités de traitement : chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie. Il s'agit d'une thérapeutique prometteuse dont l'évolution est liée aux progrès en biologie moléculaire et à la compréhension des mécanismes de croissance tumorale et de métastases.

1.3.3/ Traitement physique

1.3.3.1/ Radiothérapie

1.3.3.1.1/ Définition – Généralités

C'est une technique thérapeutique consistant à exposer une partie précise du corps à des rayonnements ionisants, ces derniers étant toxiques pour les tissus vivants.

C'est le traitement le plus répandu des cancers, avec la chirurgie, à laquelle elle est le plus souvent associée ainsi qu'à la chimiothérapie. Elle contribue au traitement de près de 70% des cancers. En France, 70 000 cancéreux sont traités chaque année par cette méthode ⁽⁷⁹⁾.

Son utilisation bien développée pour les carnivores domestiques outre-atlantique est en France limitée par le nombre de sites où elle est accessible.

1.3.3.1.2/ Principe

C'est dès le début du XX^{ème} siècle que la radiothérapie vient renforcer l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux (Despeignes à Lyon) jusque-là réduit à la seule chirurgie avec la découverte des rayons X par Roentgen. A l'étude des radiations naturelles est venue s'ajouter la découverte de la radioactivité artificielle par Curie en 1934, des rayonnements de haute énergie et des particules lourdes.

Pour les radiations électromagnétiques parmi lesquelles (Cf. fig. n°11) on peut aussi compter les ondes radio, télévision, micro-ondes et lumière visible, leur énergie est donnée par la formule :

$$E = h \cdot c/\lambda$$

c : la vitesse de la lumière (299792458 m/s)

h : constante de Planck ($6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J s)

λ : longueur d'onde

Pour cela les radiations doivent avoir suffisamment d'énergie pour provoquer l'ionisation des molécules (Cf. fig. n° 11). Un rayonnement est dit ionisant s'il transporte une énergie suffisante pour ioniser une molécule organique. Cette énergie minimum est de 33 électronvolts (eV).

Les radiations utilisées ont des longueurs d'onde courtes, de l'ordre de 10^{-9} m.

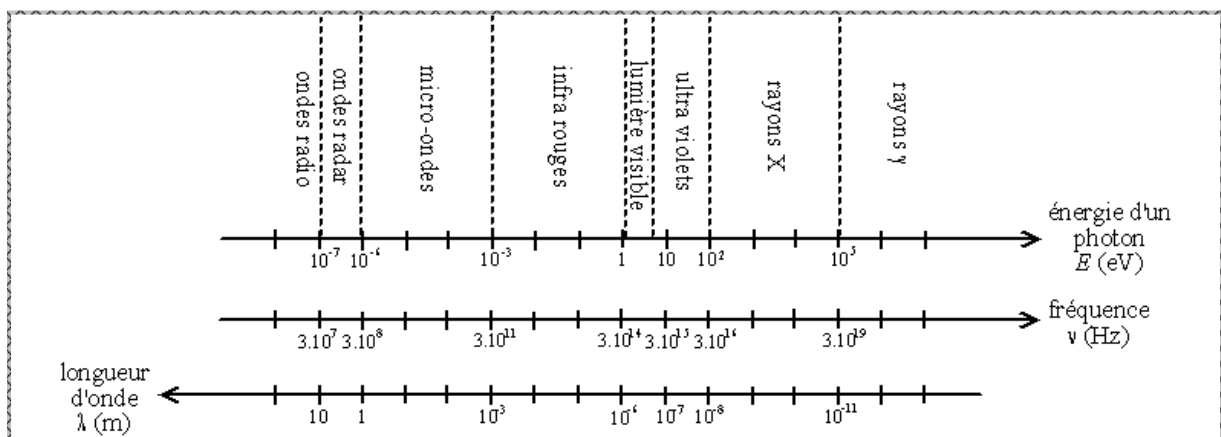


Figure n° 11 : Schéma représentant spectre des ondes électromagnétiques

On peut classer ces radiations en radiations ionisantes directes ou indirectes. La plupart sont directes, c'est à dire qu'elles perturbent la structure de la molécule par interaction directe avec celle-ci. Les radiations ionisantes indirectes sont les radiations électromagnétiques. Elles causent des dommages structuraux par le biais de processus chimiques intermédiaires, faisant intervenir l'oxygène avec la formation de radicaux libres (OH° et H°) qui ont une action sur le cytoplasme, la membrane et surtout l'ADN. Cette altération peut conduire à la mort de la cellule si la molécule altérée joue un rôle essentiel dans le cycle cellulaire ⁽⁷⁹⁾.

1.3.3.1.3/ Méthodes

L'obtention des différents types de radiations ionisantes a nécessité la mise au point de dispositifs adaptés capables de contrôler ou générer de tels rayonnements.

Les modalités du traitement par radiothérapie varient selon que l'on applique le rayonnement à distance du tissu (téléthérapie) ou que le rayonnement soit délivré au sein du tissu (curiethérapie) ^(73,74).

1.3.3.1.3.1/ Téléthérapie

Il s'agit d'une application externe, la source du rayonnement étant à distance. On reconnaît plusieurs dispositifs.

1.3.3.1.3.1.1/ Orthovoltage

Basé sur les rayons X, créés sur le même principe que lors d'une radiographie, à savoir que des électrons (e^-) sont accélérés par une différence de potentiel entre l'anode et la cathode. Cependant cette différence est ici plus élevée permettant de produire des photons de 50 à 300 keV. Abandonnée en médecine humaine de part sa faible énergie qui en limite les utilisations, elle reste cependant utilisée en médecine vétérinaire pour de tumeurs cutanées ou des tissus mous superficiels. Citons parmi ses inconvénients, l'absorption accrue de l'énergie par les tissus osseux par rapport aux tissus mous, et les effets cutanés (radiodermes).

1.3.3.1.3.1.2/ Césium 137 radioactif

Emetteur de rayons γ , d'énergie supérieure (0,662 MeV), il permet des traitements limités en pénétration. A ce niveau d'énergie les e^- libres produits contribuent aux effets de surface, à savoir que les e^- libres produits lorsque le rayon γ entre en contact avec une molécule ont une célérité suffisante pour parcourir quelques millimètres avant d'interagir avec une autre molécule, c'est l'effet de surface. Cet effet est très limité dans le cas du Césium.

1.3.3.1.3.1.3/ Cobalt 60 radioactif

Emetteur de rayons γ d'énergie supérieure (1,25 MeV) va permettre le traitement de tumeurs plus profondes. De plus son utilisation n'est pas restreinte aux tissus mous, les tissus osseux absorbant la même quantité d'énergie, il n'y a donc pas de surdosage du tissu osseux. L'effet de surface est plus important, évalué jusqu'à 5 mm de profondeur. Cependant ces sources radioactives ont une demi-vie parfois courte comme le cobalt ($t_{1/2} = 5$ ans), il faut donc renouveler la source. Ce sont les dispositifs les plus utilisés, mais remplacés peu à peu par des accélérateurs de particules ⁽⁷⁴⁾.

1.3.3.1.3.1.4/ Accélérateur linéaire

Appareillage permettant de mettre en mouvement des particules (rayons X, e^-) leur conférant ainsi une énergie importante (de 4 à 20 MeV). De telles énergies permettent une pénétration tissulaire importante et plus précise pour le traitement de tumeurs très profondes et voisines de structures osseuses et organes vitaux. L'effet de surface, proportionnel à l'énergie des particules, est de 25mm pour 10 MeV.

Autre dispositif plus récent, le cyclotron permet d'accélérer des neutrons (> 6 MeV) et offre de nouvelles perspectives thérapeutiques ⁽⁷⁴⁾.

L'emploi de telles thérapeutiques reste plus limité, car leur installation est très coûteuse en argent et en personnel.

1.3.3.1.3.2/ Curiethérapie

La curiethérapie (ou brachythérapie, terminologie anglo-saxonne) est l'utilisation de radio-isotopes en applications locales, en surface, dans la tumeur ou encore de manière systémique.

Les différents radio-isotopes utilisables sont énumérés dans le tableau ci-dessous (Cf. tableau n° 12). On utilise des sources scellées, c'est à dire entourées d'une enveloppe, qui évite que le corps radioactif ne se fragmente et se disperse (radium, iridium et césium) et des sources non scellées (iode). Les sources scellées se présentent pour le césium sous forme de

mini-tubes de 2 mm de diamètre sur 2 cm de long et des fils d'iridium de 0,3 à 0,5 cm de diamètre qu'il est possible de couper à la demande.

Dans la curiethérapie interstitielle ou endocuriethérapie, on implante les sources radioactives à l'intérieur des tissus (peau, sein, anus, prostate, etc...) alors que pour la curiethérapie endocavitaire ou plésiocuriethérapie les sources sont placées dans les cavités naturelles (utérus, vagin, etc...).

Dernière possibilité de traitement, la curiethérapie métabolique, qui consiste à injecter des produits radioactifs en solution par voie veineuse. Par exemple, l'iode 131 est utilisé pour le traitement de tumeurs de la thyroïde car il est préférentiellement fixé par les cellules de la thyroïde et le phosphore 32 dont la fixation est fonction de la composition chimique (sels de phosphate) est utilisé pour le traitement de la polyglobulie primitive.

La radiothérapie s'adresse à de nombreux et divers cancers, tant qu'ils sont accessibles et de petite taille ⁽²⁷⁾.

Source	Radiation	Application
Strontium 90	Rayons β , particules	- Appliqué sur surface tumorale (pénétration max. 3-4 mm)
Or 198	Rayons γ	- Appliqué sur surface tumorale - Implanté dans la tumeur
Caesium 137	Rayons γ	- Implanté dans la tumeur
Iridium 192	Rayons γ	- Implanté dans la tumeur
Iode 125 131	Rayons γ Rayons γ et β	- Implanté dans la tumeur - Administration systémique (tumeurs de la thyroïde)
Phosphore 32	Rayons β	- Administration systémique (traitement de la polyglobulie primitive)

Figure n° 12 : Sources radioactives utilisables dans le cadre de la curiethérapie (d'après 27).

1.3.3.1.4/ Applications cliniques

L'application de ce type de thérapies et sa réussite nécessite une bonne évaluation de l'état du patient, de la tumeur (le type histologique, le volume et l'existence de métastases) et la mise en place d'un plan de traitement adéquat. En effet la radiocurabilité d'une tumeur dépend :

- de la radiosensibilité intrinsèque
- de la taille
- de la dose

Plusieurs facteurs cités ci-dessus doivent être considérés afin de mener à bien la radiothérapie et atteindre les objectifs thérapeutiques fixés (traitement palliatif ou curatif).

La radiothérapie est principalement un traitement adjuvant dans l'arsenal disponible dans la lutte contre le cancer. Elle est utilisée en médecine vétérinaire lorsque la chirurgie ne permet pas une exérèse complète avec des marges saines, pour des tumeurs des cavités nasales, de la cavité orale, fibrosarcomes et tumeurs sur les extrémités.

Dans le traitement de tumeurs squelettiques appendiculaires, la radiothérapie s'inscrit dans le cadre d'un traitement conservateur, combinée à la chimiothérapie et la chirurgie ⁽²⁶⁾.

En médecine humaine les applications sont rares, l'utilisation de la chimiothérapie étant le traitement adjuvant de choix à la chirurgie. L'irradiation locale à visée curative en première intention n'apporte pas de bénéfice en termes de survie dans le traitement de l'ostéosarcome compte tenu de la radiorésistance tumorale et des doses élevées à délivrer pour obtenir une stérilisation tumorale. L'association de photons et de neutrons augmente les chances de contrôle local et de survie sans. Aucune donnée ne permet de conclure sur l'intérêt de la radiothérapie en ce qui concerne la prévention des récidives locales ou encore le traitement des ostéosarcomes en récidive locale ⁽²⁹⁾.

La radiothérapie est donc utilisée lors de traitement de tumeurs inopérables. La radiothérapie est alors à but curatif avec des doses de 50 à 70 Gy *in toto* selon la localisation ⁽²⁹⁾.

1.3.3.2/ Hyperthermie

1.3.3.2.1/ Définition – Généralités

Élévation locale, régionale ou générale de la température du corps, au-dessus de la normale de 38,5-39°C pour les carnivores domestiques et 37-37,5°C pour l'homme, afin de détruire les cellules malignes. Les températures cibles étant en général comprises entre 42°C et 50°C, l'hyperthermie est qualifiée de modérée ^(36,45,52).

Il s'agit d'une technique encore peu utilisée dans le traitement de cancers à l'heure actuelle, elle est le sujet de nombreux essais cliniques chez l'homme en tant que thérapie adjuvante de la radiothérapie. Chez les carnivores domestiques le nombre d'études cliniques ne cesse d'augmenter comme le traduit le nombre de publications.

Rq : On parle de fièvre lorsqu'elle traduit une maladie.

1.3.3.2.2/ Principe et méthodes

L'hyperthermie a été depuis longtemps proposée pour traiter les processus tumoraux, ainsi le papyrus médical égyptien Edwin Smith ^(36,46), vieux de près de cinq mille ans, rapporte une tentative de traitement d'un cancer du sein à l'aide d'une "tige chauffée". Hippocrate en fait état dans ses aphorismes, il propose la cautérisation de la surface tumorale par l'application d'un fer chaud. Il faut attendre le XIX^{ème} siècle pour que le développement de l'hyperthermie se précipite. Ainsi Busch ⁽³⁶⁾, est le premier, en 1866, à décrire la "guérison" d'un sarcome multifocal à l'occasion d'un érysipèle (disparition des lésions cutanées et faciales). A cette époque l'utilisation de la pyrothérapie (provoquer la fièvre à des fins thérapeutiques) occasionne des cas de régression, voire quelques "guérisons" de cancers, à la suite de grands états fébriles causés par des infections. On cherchera alors à créer des fièvres artificielles, principalement à l'aide de toxines, de bactéries ou bains d'eau chaude. Coley ⁽³⁶⁾ utilise en 1893 l'érysipèle ou un mélange de toxines bactériennes à base d'extraits de Staphylocoques et de Serratia.

Cependant ces tentatives quelque peu empiriques avec des résultats inconstants, décevants ainsi que quelques accidents, suivis de l'arrivée en 1895 des rayons X, qui allaient

se révéler une arme majeure dans le traitement du cancer, vont fortement diminuer l'intérêt porté à l'hyperthermie ⁽³⁶⁾.

Les investigations ultérieures sur les effets de températures élevées sur des cultures cellulaires vont permettre le développement de l'hyperthermie en tant que modalité thérapeutique moins empirique. En effet, l'établissement des bases scientifiques pour l'utilisation de l'hyperthermie est relativement récent. De multiples expérimentations permettent aujourd'hui de comprendre les mécanismes induits et les effets de l'hyperthermie que nous allons rappeler succinctement afin de permettre de comprendre l'intérêt de cette technique thérapeutique. Les effets résultent probablement d'une combinaison d'effets tissulaires, cellulaires, moléculaires et environnementaux.

1.3.3.2.1/ Effets biologiques de l'hyperthermie

1.3.3.2.1.1/ A l'échelle tissulaire

L'échauffement thermique d'un tissu est dépendant de plusieurs paramètres ⁽³⁶⁾ :

- Le flux sanguin, qui joue un rôle prépondérant de convection thermique, est capable de capter, de véhiculer et d'évacuer hors du volume cible une partie de la chaleur induite par échanges thermiques.
- La conduction thermique du tissu, caractérise la capacité du tissu à laisser s'écouler la chaleur des zones les plus chaudes vers les zones les plus froides du tissu. Cette conductivité est fonction de la teneur en eau des tissus, elle est donc plus importante pour du tissu musculaire par rapport à du tissu adipeux qui est pauvre en eau.

Ces principaux paramètres fluctuent en fonction du type tissulaire, or un tissu tumoral présente une architecture propre. Elle est le résultat d'une prolifération anarchique de cellules malignes, qui souvent n'est pas proportionnelle à l'expansion du réseau vasculaire néoformé. A quantité égale de tissu normal/tumoral, on a donc un réseau vasculaire inférieur pour dissiper la chaleur qui va conduire à une augmentation de la température supérieure à celle d'un tissu dont le flux sanguin serait deux fois supérieur. Ce qui pourrait être schématisé par le graphique ci-dessous (Cf. fig. n°13) :

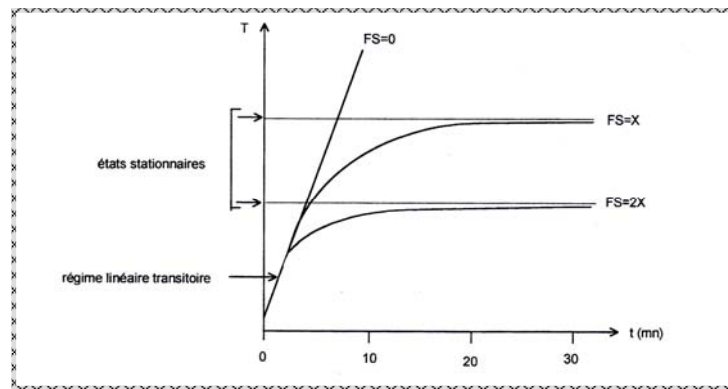


Figure n° 13 : représentation schématique de la cinétique d'échauffement d'un tissu biologique pour une énergie thermogène fournie : variations de la température en un point donné d'un volume cible, en fonction du temps t pour différents ordres de grandeur du flux sanguin FS supposé constant (d'après 36).

Pour une même énergie fournie l'échauffement est supérieur pour le tissu tumoral, dont les effets sont un collapsus vasculaire qui intervient à partir d'un seuil de traitement thermique de 30 à 60 minutes à 41°C à 43°C. Des valeurs de température supérieures conduisent à une stase vasculaire, une coagulation voire une carbonisation lorsqu'on atteint des niveaux d'hyperthermie de l'ordre de 56°C ^(39,51).

Cette stase a bien entendu des conséquences pour l'environnement cellulaire, elle diminue l'oxygénation des tissus et influe sur le pH interstitiel. Notons que le pH du milieu tumoral a en temps normal des valeurs généralement inférieures à celles des tissus normaux correspondants lié à une accumulation de catabolites acides (acide lactique). L'hyperthermie va entraîner une diminution de ce pH par la favorisation d'un métabolisme anaérobie entre autres, que des relations expérimentales permettent d'évaluer.

- D'après Rahn et al ⁽³⁶⁾, la variation directe du pH intracellulaire en fonction de l'élévation de la température est en moyenne de -0,016 unité de pH pour un degré Celsius :

$$\Delta \text{pH intracellulaire} / \Delta T = -0,016 \text{ UpH.C-1}$$

- Selon Harrison et Walker ⁽³⁶⁾, le pH extracellulaire varie quant à lui de -0,023 unité pH par degré Celsius :

$$\Delta \text{pH extracellulaire} / \Delta T = -0,023 \text{ UpH.C-1}$$

L'utilisation de températures d'au moins 42-45°C laisse escompter une diminution non négligeable du pH tumoral ^(27,36).

Ces différents effets conduisent à l'installation d'un milieu dysgénésique, inhibant la prolifération cellulaire et provoquant la mort cellulaire suite à un ensemble d'altérations dont on envisagera les modalités à l'échelle cellulaire et moléculaire.

1.3.3.2.2.1.2/ A l'échelle cellulaire

Les effets de l'hyperthermie, qui sont ici évalués essentiellement *in vitro*, conduisent à définir une thermosensibilité cellulaire, il s'agit de la sensibilité des cellules à l'action létale de l'hyperthermie. Elle est fonction des conditions du traitement thermique : l'intensité de la température et le temps d'exposition (Cf. fig. n° 14).

Autre facteur influençant la thermosensibilité : le cycle cellulaire, avec une thermosensibilité maximale pendant la mitose (surtout en métaphase), viennent ensuite les cellules en phase S puis les cellules en phase G1 comme les moins sensibles.

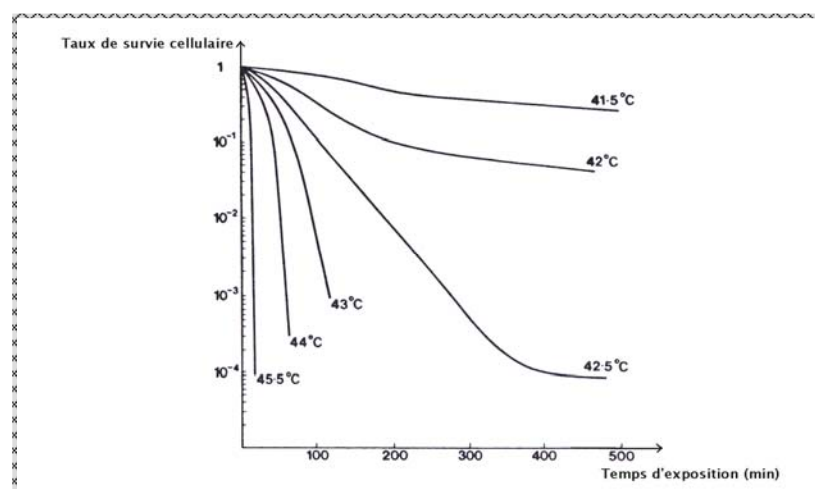


Figure n° 14 : Courbes de survie cellulaire en fonction du temps d'exposition (d'après 27).

Ce ne sont pas les seuls facteurs évoqués, les conditions environnementales influent aussi sur la thermosensibilité cellulaire ⁽³⁶⁾:

- le pH interviendrait comme facteur aggravant de la thermosensibilité pour des valeurs inférieures aux valeurs physiologiques.
- le degré d'oxygénation dont le rôle est moins clairement défini, conduit les cellules à être plus sensibles car en hypoxie et donc en déséquilibre énergétique.

Parallèlement à cette notion de thermosensibilité, vient s'opposer une autre notion, celle de la thermorésistance. Une thermorésistance acquise est décrite mais son exploration est fortement compliquée par une thermorésistance induite. En effet le fait de soumettre une culture cellulaire à une hyperthermie modérée pendant un court laps de temps confère à cette population cellulaire un taux de survie cellulaire supérieur à une population non préalablement traitée. Cette thermorésistance s'appuie sur divers mécanismes dont l'expression de protéines spécifiques.

Il s'agit des Heat Shock Proteins (HSP), dont la synthèse est initiée ou fortement augmentée sous l'effet de divers stress, notamment un stress thermique. Leur mode d'action encore peu connu résiderait dans leur capacité à se lier aux sites hydrophobes d'autres protéines leur permettant de conserver leur intégrité structurale et fonctionnelle.

Cependant le rôle des HSP s'est vu étendu, en particulier pour la famille des HSP 70. Leur production au sein de la cellule va entraîner une augmentation du nombre de récepteurs CMH I et d'antigènes endogènes. Parallèlement, les cellules mortes vont libérer ces HSP 70 qui activent le système immunitaire, contribuant ainsi à une certaine immunité anti-tumorale ⁽⁴⁹⁾. KUBISTA et al ont démontré l'expression accrue de HSP 72 par des cellules de chondrosarcome et ostéosarcome suite à un traitement thermique conduisant à leur reconnaissance par les lymphocytes NK ⁽⁶³⁾.

1.3.3.2.2.1.3/ A l'échelle moléculaire

Les effets de l'hyperthermie sont liés à la capacité de désorganisation des structures cellulaires. Une modification de la conformation des structures moléculaires (conformation tridimensionnelle voir quaternaire) et donc des capacités fonctionnelles est causée par la rupture de liaisons hydrogène ou des liaisons pôles hydrophobes et/ou hydrophiles. Les protéines dénaturées ne sont plus capables de remplir leur rôle, par exemple la duplication et la transcription de l'ADN, conduisant à la mort cellulaire ⁽²⁷⁾.

Les effets de l'hyperthermie intéressent aussi la membrane cytoplasmique en agissant sur les structures lipoprotéiques, et modifient la perméabilité membranaire ⁽³⁶⁾.

Les voies métaboliques sont aussi modifiées, le métabolisme aérobie temporairement augmenté est rapidement remplacé par un métabolisme anaérobie de faible rendement énergétique ⁽¹⁹⁾.

1.3.3.2.2/ Méthodes

Les mécanismes d'action de l'hyperthermie et ses effets ayant été brièvement évoqués, nous allons nous intéresser à ses applications thérapeutiques. Ces applications n'ont cessé de s'étendre durant le dernier quart de siècle, avec des applications tantôt systémiques tantôt locales, elles ont conduit à la mise en place de dispositifs d'application du traitement thermique en adéquation avec le résultat recherché (Cf. fig. n°15).

De nos jours, l'attention se porte sur trois types de méthodes principalement, celles basées sur les ondes électromagnétiques avec les radiofréquences et les micro-ondes, celles utilisant des nanoparticules métalliques couplées à un champ électromagnétique.

1.3.3.2.2.1/ Ondes électromagnétiques

Ce sont des phénomènes associant un champ électrique et un champ magnétique vectoriels caractérisés par leur puissance et leur fréquence. Cette dernière permet de les situer sur le spectre électromagnétique

1.3.3.2.2.1.1/ Radiofréquences

Les radiofréquences correspondent à des fréquences s'étendant de quelques kHz à 300 MHz. Leur emploi à des fins thérapeutiques nécessite l'utilisation d'applicateurs électriques ou magnétiques selon le résultat souhaité. Des électrodes planes, de forme circulaire ou rectangulaire placées de part et d'autre du tissu à traiter pour l'hyperthermie capacitive, des applicateurs de type magnétique (bobines à enroulement plan ou hélicoïdal) favorisent le champ magnétique pour le transfert énergétique grâce aux courants de FOUCAULT pour l'hyperthermie inductive. Pour l'hyperthermie radiative, l'énergie est propagée par des applicateurs électriques fonctionnant indépendamment ⁽¹⁶⁾ et puis l'hyperthermie interstitielle, appliquée via de nombreux types d'aiguilles ou fils métalliques ⁽³⁶⁾.

L'inconvénient de ces techniques est l'hétérogénéité des tissus (graisse/muscle, os/muscle), véritables interfaces entraînant une hétérogénéité du champ magnétique avec des zones surchauffées (phénomène de hot spot) ⁽²⁷⁾.

Ces appareillages vont évoluer, en particulier par la mise en œuvre d'un nombre accru d'applicateurs, ce qui permettra de résoudre les problèmes rencontrés actuellement lors de leur utilisation ⁽³⁶⁾.

1.3.3.2.2.1.2/ Micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de fréquence supérieure allant de 300 MHz à 300 GHz, appliquées par des antennes externes ou implantées au sein du tissu. Elles vont entraîner une oscillation rotatoire des molécules polaires (H₂O) à l'origine de l'échauffement.

1.3.3.2.2.2/ Ultrasons

Les ultrasons, qui correspondent à des ondes mécaniques dont les fréquences utilisées s'échelonnent de 0,3 MHz à 3 MHz, ont vu leurs applications limitées par la grande différence d'impédance acoustique entre les tissus mous, l'os et l'air. Ces caractéristiques sont à l'origine de phénomènes de réflexion sur ces interfaces et ayant des conséquences néfastes comme la surexposition des os.

Ces différents systèmes ont des lacunes, dans l'étendue de leurs effets, mais aussi dans leurs applications. Les régions où la vascularisation est importante sont ainsi difficiles à traiter à cause des effets de convection qui entraînent des variations de température. Ces zones correspondent à des zones sous-traitées. Ces limites ne permettent pas l'application de telles méthodes à des tumeurs hépatiques, rénales ou spléniques. Autre facteur limitant, les structures osseuses formant une barrière (ultrasons) empêchent le traitement de tumeurs situées dans la ceinture pelvienne, le crâne ou les membres.

Récapitulatif des utilisations		
Type d'application de l'hyperthermie	Zone traitée	Méthodes
Locale	Une tumeur localisée	Non invasive : - radiofréquences - infrarouge - ultrasons
		Invasives : - radiofréquences - micro-ondes - Particules magnétiques
Régionale	Organe ou membre	- Perfusion
Intégral	Tout le corps	- Pyrogènes
		- Bains chauds (eau, cire) - Perfusion - Infrarouge

Figure n° 15 : Récapitulatif des dispositifs utilisables dans l'application du traitement thermique.

L'hyperthermie continue à faire l'objet de recherches constantes, essentiellement sur les dispositifs d'application ^(2,44). C'est ainsi que dès les années 1970, de nouveaux dispositifs vont être mis au point basés sur l'utilisation de particules métalliques, plus précisément des nanoparticules. Nous allons voir dans une seconde partie, le développement des dispositifs construits sur les propriétés de telles particules et les recherches sur les particules elles-mêmes.

2/ L'utilisation des nanoparticules dans le traitement des tumeurs

L'utilisation de nanoparticules magnétiques n'a fait que croître depuis 40 ans offrant des possibilités diverses pour la médecine. Tout d'abord, ce sont des édifices moléculaires cristallins dont on peut contrôler la taille. De quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres, soit de taille égale voir inférieure aux éléments biologiques comme une cellule (10-100 μm), un virus (20-450 nm), une protéine (5-50 nm) ou un gène (2 x 100 nm). On peut donc envisager de faire interagir ces nanoparticules avec ces éléments. Le terme de nanoparticule est généralement employé pour des particules de taille inférieure ou égale à 1 μm ^(11,17,37,57).

De plus leur structure peut-être modifiée avec l'adjonction de molécules sur leur surface afin de favoriser ou éviter leur contact avec les éléments biologiques. Un contrôle du devenir de ces nanoparticules au sein de l'organisme est donc possible ⁽⁵⁶⁾.

Par ailleurs, ce sont des composés magnétiques, cette propriété fait d'eux des particules obéissant à la loi de Coulomb et peuvent donc être manipulées par un champ magnétique extérieur. Cette action à distance combinée à leur biocompatibilité permet d'envisager des applications diverses ^(3,17).

Cela comprend la capacité à transporter et/ou immobiliser ces nanoparticules dans un tissu, de les adresser à un type cellulaire. De cette manière il serait possible de délivrer une autre molécule comme un principe actif ou un radionucléide sur un site ou tissu précis tel qu'une tumeur.

Enfin ces nanoparticules soumises à un champ magnétique induit par un courant alternatif vont permettre la production d'énergie thermique, énergie qui peut-être utilisée pour augmenter la température d'un tissu localement par transfert thermique. Cette propriété est exploitée dans le traitement des tumeurs par l'hyperthermie qui permet une destruction locale du tissu tumoral sans effets délétères sur le tissu sain ^(38,41,42).

De telles applications sont essentiellement dues aux propriétés magnétiques spécifiques de ces nanoparticules.

Dans cette partie, nous allons revenir succinctement sur ces propriétés physico-chimiques et magnétiques, puis nous développerons les applications aboutissant à une thérapeutique anticancéreuse comme le transport de molécules de chimiothérapie et l'hyperthermie.

2.1/ Propriétés physico-chimiques des nanoparticules ferromagnétiques

Les nanoparticules métalliques ont des propriétés physico-chimiques spécifiques qui vont influencer leur comportement dans l'organisme. La réussite des applications dépend donc de la capacité à moduler ces propriétés pour obtenir le résultat escompté. Tout d'abord, les problèmes rencontrés ne sont pas les mêmes selon la voie d'administration utilisée : intra vasculaire (intra veineuse ou intra artérielle) ou intra tumorale. Lors d'administration intra vasculaire, les nanoparticules ne doivent pas s'agréger au risque d'entraîner une embolisation. La mise au point de suspensions stables est nécessaire pour la voie systémique ⁽¹¹⁾, contrairement à la voie locale.

Ensuite la diffusion des nanoparticules vers les tissus cibles doit être contrôlée. Brightman a démontré que les particules ferriques de 9 nm diffusent rapidement via les espaces intercellulaires pour atteindre une répartition uniforme dans le tissu en quelques minutes ⁽⁷⁵⁾. Cependant il existe deux exceptions, les tissus situés derrière la barrière hémato-méningée et les tubules rénaux dont les espaces intercellulaires sont inférieurs au nanomètre du fait des jonctions serrées. La diffusion des nanoparticules est certainement aidée par le gradient de pression et de concentration du vaisseau vers les espaces intercellulaires. Néanmoins les nanoparticules de plus de 50-100 nm ne participent pas à ce phénomène de diffusion passive et vont se déposer sur les parois des vaisseaux, augmentant le risque de thrombus, mais pouvant être à l'origine d'applications thérapeutiques ^(17,75). Ce sont donc les nanoparticules de 5 à 10 nm de diamètre qui semblent être la forme adéquate pour l'hyperthermie.

Enfin, il faut que les nanoparticules soient biocompatibles, or selon Babincova les nanoparticules magnétiques sont bien tolérées, par exemple les nanoparticules revêtues de dextran n'ont pas présenté de toxicité mesurable (DL_{50}) ⁽⁶⁾ ou très supérieure aux doses thérapeutiques ⁽¹⁸⁾. Mais d'autres auteurs ont montré une cytotoxicité dont l'intensité est fonction du revêtement, ainsi un revêtement cationique s'est avéré être cytotoxique envers des cellules d'adénocarcinome mammaire ⁽⁴¹⁾.

Une fois les nanoparticules dans le sang, elles sont rapidement recouvertes par des composés biologiques comme des protéines, un phénomène nommé opsonisation qui doit être contrôlé. L'opsonisation va rendre ces nanoparticules détectables par les cellules du système réticulo-histiocytaire comme les macrophages circulants et les cellules de Kupffer ⁽⁵⁶⁾. Ceci

permet de conclure que des applications *in vivo* vont nécessiter de modifier la surface des particules afin qu'elles ne soient pas détectables par le système réticulo-histiocytaire ⁽⁷⁵⁾.

Les nanoparticules dont la surface est hydrophobe sont rapidement recouvertes de composés du plasma et éliminées de la circulation. Tandis que les nanoparticules hydrophiles n'entrent pas dans ce processus et sont éliminées plus lentement ⁽⁷⁵⁾.

De tels paramètres ont été pris en compte dans la mise au point de nanoparticules stables au sein de l'organisme, conduisant à l'utilisation de diverses molécules dont le dextran et ses dérivés, le polyéthylène glycol (PEG), l'acide folique, l'albumine ^(11,20,86). De telles modifications permettent d'augmenter l'absorption des nanoparticules par les cellules cancéreuses. Zhang a démontré une absorption accrue de nanoparticules lorsqu'elles sont revêtues de PEG et d'acide folique par des cellules tumorales mammaires ⁽⁸⁸⁾.

2.2/ Propriétés magnétiques des nanoparticules ferromagnétiques

Domaine de recherche en plein essor du fait des problèmes fondamentaux soulevés par ces nanoparticules, aussi bien en ce qui concerne les propriétés dynamiques du moment magnétique, que les questions liées aux interactions inter particules. Cet intérêt pour les nanotechnologies s'explique par des applications diverses : course à la miniaturisation des composants électroniques ou en médecine humaine.

Les propriétés magnétiques d'un solide dérivent de sa structure cristallographique et de l'existence de spins non appariés sur les atomes le constituant. Le moment magnétique d'un atome a trois origines principales :

- le spin des e^-
- le moment cinétique orbital de l' e^- par rapport au noyau
- la variation du moment orbital créée par l'application d'un champ magnétique.

Les états d'énergie électronique d'un atome peuplé par un nombre pair d' e^- ne contribuent pas au magnétisme car leurs spins s'annulent (principe d'exclusion de Pauli). Dans les métaux comme le cobalt, le nickel ou le fer, l'origine du magnétisme est due en premier lieu à l'existence d' e^- célibataires sur la couche 3d des ions métalliques.

2.2.1/ Principaux types de comportements magnétiques des nanoparticules

Un atome libre est dit magnétique s'il porte un moment magnétique permanent qui possède un module constant. Un matériau est formé d'atomes magnétiques ou non magnétiques et l'aimantation du matériau est la résultante de ces moments magnétiques. Les moments magnétiques dépendent de l'environnement magnétique de chaque atome, à savoir la nature et la position des atomes voisins, la température et le champ magnétique appliqué.

Nous allons décrire de manière sommaire les principaux types de comportements magnétiques que l'on peut rencontrer dans la matière, le diamagnétisme, le paramagnétisme, le ferromagnétisme et le superparamagnétisme qui nous intéressent plus particulièrement.

2.2.1.1/ Le diamagnétisme

Le diamagnétisme décrit le magnétisme de substances formées d'atomes sans moments magnétiques. L'aimantation M , induite par un champ magnétique appliqué H , est très faible et s'oppose à ce dernier. La susceptibilité magnétique χ , c'est à dire la pente de la courbe d'aimantation $M(H)$ ($\chi = dM/dH$) est négative (Cf. fig. n° 16).

2.2.1.2/ Le paramagnétisme

Le paramagnétisme décrit le magnétisme dans un matériau où les moments magnétiques des atomes sont désordonnés et sans corrélation. La susceptibilité paramagnétique χ_p est toujours positive (Cf. fig. n° 16) prenant des valeurs de 10^{-6} à 10^{-3} .

Dans les métaux, les couches électroniques internes se recouvrent faiblement et possèdent donc une contribution diamagnétique.

Mais à cette susceptibilité diamagnétique des couches internes, il faut ajouter celle des e- des bandes incomplètes qui possèdent un paramagnétisme de spin de Pauli.

La susceptibilité s'exprime par : $\chi_p = 2D\Omega(E_F)\mu_B^2$

μ_B : le magnéton de Bohr

$2D\Omega(E_F)$: la densité d'état

2.2.1.3/ Le ferromagnétisme

Certains matériaux possèdent une aimantation spontanée, il s'agit du ferromagnétisme et du superparamagnétisme.

$$\lim_{H \rightarrow 0} M(H) \rightarrow M_0 \neq 0$$

$$H \rightarrow 0$$

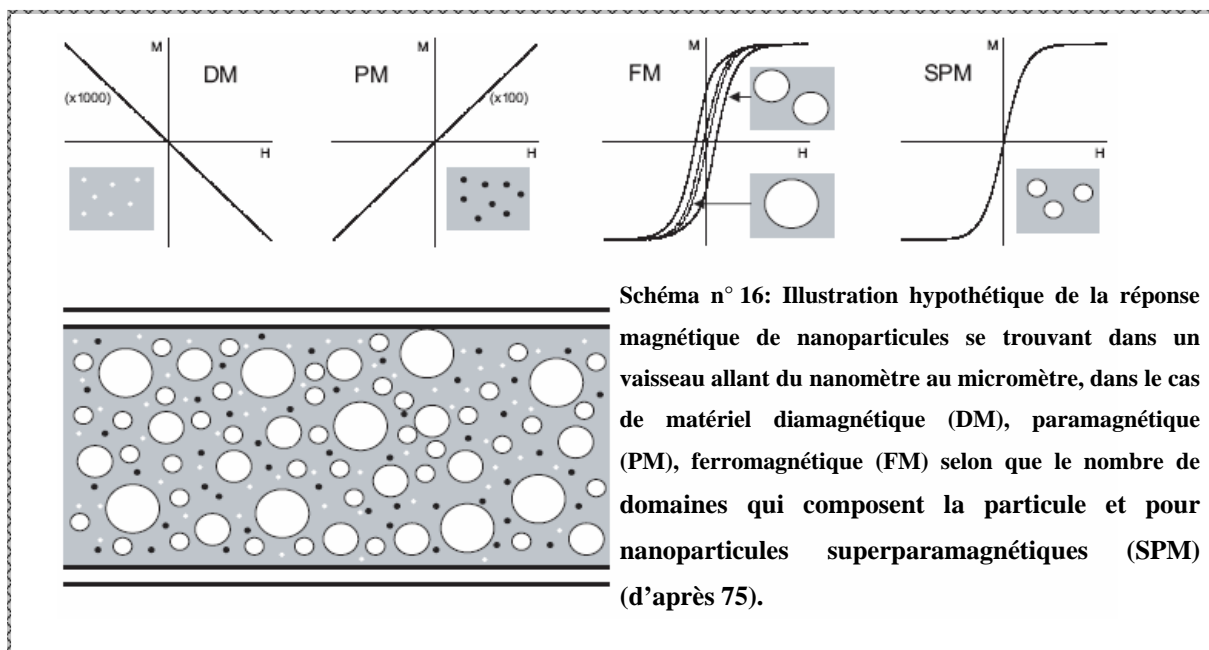
L'aimantation spontanée M_0 de certains matériaux peut-être expliquée par la mise en ordre des moments magnétiques ; les matériaux mettent en évidence un comportement collectif des moments magnétiques qui est induit par des interactions entre moments voisins, c'est le ferromagnétisme. Il correspond à un alignement parallèle de tous les spins, au moins en moyenne. En fait tout se passe comme si un champ magnétique (appelé champ moléculaire) alignait les moments magnétiques, mais ce n'est pas un champ magnétique réel.

Pour un corps ferromagnétique massif, bien qu'il existe une aimantation spontanée, le moment magnétique global peut être nul. Cela vient du fait de l'existence de domaines magnétiques de Weiss, chaque domaine possède un grand nombre d'atomes et une direction d'aimantation globale propre. Ces domaines sont spontanément aimantés, mais d'un domaine à l'autre, la direction de l'aimantation spontanée locale varie et l'aimantation résultante de tous les domaines est globalement nulle. Mais si l'on applique un champ magnétique, la répartition et l'orientation des domaines changent et la mesure de l'aimantation change en fonction du champ appliqué. L'aimantation résultante de l'application du champ magnétique dépend aussi du nombre de domaines du matériau. Dans le cas d'un seul domaine, on parle de superparamagnétisme.

2.2.1.4/ Le superparamagnétisme

En 1949, Néel montra que des petites particules nanométriques pouvaient présenter un état magnétique original dans lequel les moments magnétiques portés par chaque particule se comportent comme les moments magnétiques portés par les atomes d'un matériau paramagnétique. Cet état fut par la suite nommé superparamagnétisme. Le comportement des nanoparticules est alors assimilé à un seul spin "géant" ⁽⁶¹⁾.

Il s'agit d'un comportement caractéristique des nanoparticules, essentiellement des particules mono domaines, soit des particules dont la taille est de 10 nm voire moins.



2.2.2/ Notion d'hystérésis

Sous l'action d'un champ magnétique H_a , un matériau ferromagnétique massif s'aimante par déplacement des parois de Bloch (parois du domaine). Si le champ est suffisamment faible, ces déplacements de parois sont réversibles et donc les variations de l'aimantation sont réversibles. Si le champ appliqué H_a dépasse une valeur critique H_{aC} , les déplacements des parois sont alors brutaux et irréversibles. Si le champ appliqué H_a est suffisamment élevé, l'aimantation augmente par rotation des domaines et tend à atteindre une aimantation maximum qui est l'aimantation à saturation M_s .

Le cycle d'hystérésis donnant l'aimantation d'un matériau en fonction du champ appliqué s'obtient en exposant l'échantillon à une variation du champ magnétique et en mesurant les variations de son aimantation. La forme de ce cycle est déterminée d'une part par la taille de la particule et le nombre de domaines qui la composent (Cf. fig. n° 16).

Les caractéristiques physiques des nanoparticules superparamagnétiques sont fondées sur le temps de relaxation τ de la particule selon la formule :

$$\tau = \tau_0 \exp(\Delta E / K_B T)$$

ΔE la barrière d'énergie séparant les deux états d'orientation différente

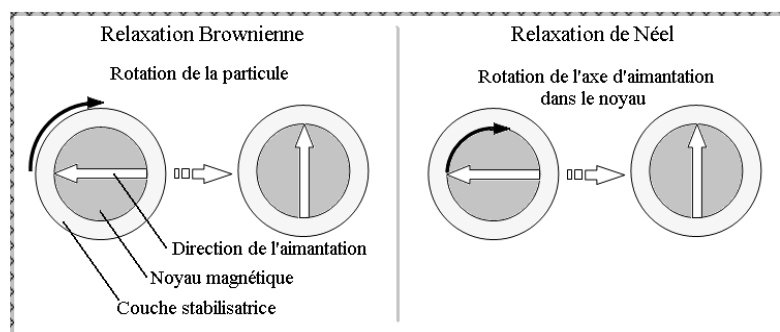
$K_B T$ l'énergie thermique

Cette barrière d'énergie étant surpassée par l'énergie fournie par le champ magnétique appliqué. Si l'on applique un champ magnétique d'intensité variable dans le temps, on a une production d'énergie thermique constante transférable au milieu dans lequel se trouvent les nanoparticules. C'est sur ce processus que s'appuie l'hyperthermie.

Il existe deux mécanismes de relaxation décrits selon l'environnement des nanoparticules (Cf. fig. n° 17). Dans un milieu liquide, les nanoparticules reviennent à un état d'énergie inférieure (état stable) selon la relaxation Brownienne, c'est à dire que la totalité de la particule effectue une rotation en quelques microsecondes.

Le second mécanisme nommé la relaxation de Néel, se traduit par la rotation de l'axe magnétique à l'intérieur du noyau magnétique, la durée de la relaxation étant de plusieurs millisecondes à plusieurs secondes. La durée de relaxation va dépendre de l'environnement de la nanoparticule.

Schéma n° 17: Mécanismes de relaxation de nanoparticules magnétiques (d'après 11).



2.3/ Utilisation en tant que transporteurs moléculaires

L'inconvénient majeur des chimiothérapies réside dans leur relative non spécificité. Administrées en intra veineux ou en intra artériel, la distribution des molécules est systémique. Tous les tissus, aussi bien les tissus tumoraux que les tissus sains sont affectés par le traitement. La toxicité exprimée est le reflet de l'action des molécules sur les tissus sains, et les doses utilisées sont limitées par ces effets délétères. Face à un tel constat, la recherche s'est orientée vers des traitements sélectifs. Ainsi dans les années 1970, des traitements sélectifs sont mis au point avec des transporteurs magnétiques ⁽¹¹⁾.

2.3.1/ Principe

Le but de telles techniques est de réduire la dose à administrer et donc les effets non recherchés tout en obtenant une concentration supérieure localement, sur les sites tumoraux. Pour ce faire, les produits cytotoxiques sont liés à des nanoparticules magnétiques et administrés par voie intraveineuse. Une fois ce complexe nanoparticule-molécule (Cf. fig. n° 19) dans le système vasculaire, un champ magnétique externe est appliqué à fin de concentrer ces complexes en un lieu donné (Cf. fig. n°18) ^(55,78).

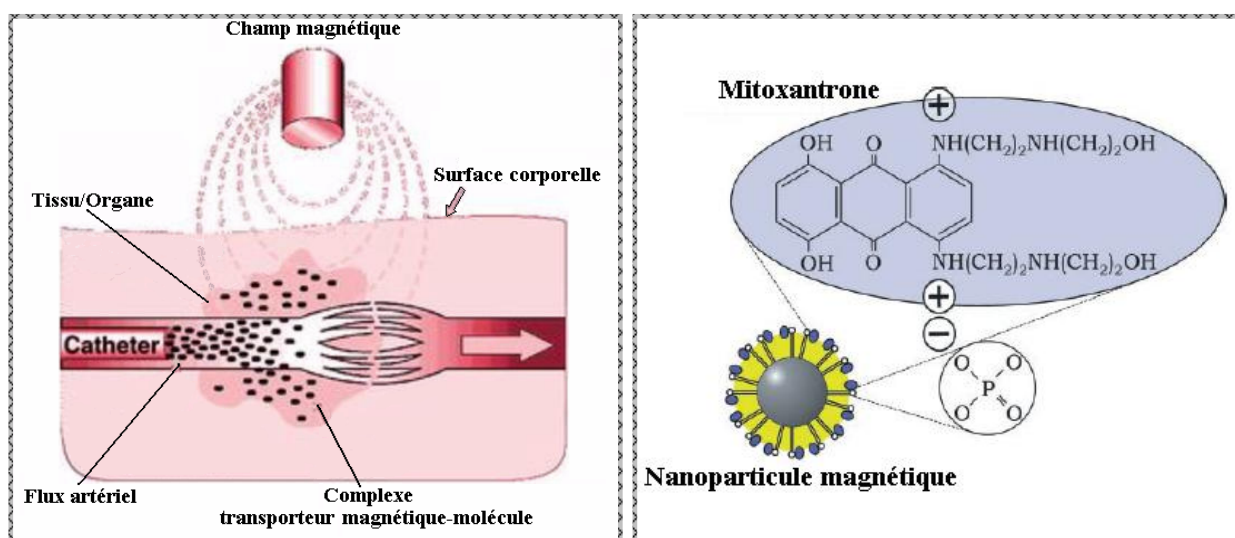


Schéma n° 18 : représentation schématique d'un transport de molécules dans un site précis. Un cathéter est placé sur un vaisseau irriguant le site et un champ magnétique est appliqué (d'après 75).

Schéma n° 19 : représentation d'un complexe nanoparticule magnétique-molécule de chimiothérapie.

Dès lors de cette accumulation locale, le produit est relâché selon divers procédés : par hydrolyse enzymatique, changement physique tel le pH, l'osmolarité ou la température, et est absorbée par les cellules cancéreuses ⁽⁵⁴⁾.

Cependant, avant de telles applications plusieurs paramètres doivent être contrôlés, en effet l'efficacité de ce type de thérapies dépend de l'intensité du champ magnétique, des caractéristiques des nanoparticules utilisées, de la profondeur du tissu cible et du volume de celui-ci, des paramètres hydrodynamiques comme le flux sanguin, et enfin la concentration en complexes nanoparticules-molécules ⁽¹⁷⁾.

La recherche sur les nanoparticules n'a cessé de progresser ; des simples micro ou nanoparticules magnétiques utilisées dans les années 1970, créées par Gordon, à aujourd'hui avec des nanoparticules très optimisées. Elles sont généralement revêtues de molécules biocompatibles comme des dérivés du dextran, polyéthylène glycol (PGE), polyéthylène oxide (PEO) et polyoxamine ^(14,35,75) et plus récemment des molécules inorganiques à base de silicium, et porteuses de groupes carboxyles. Ce revêtement a pour but de soustraire le complexe à son environnement biologique (système immunitaire, foie), évitant ainsi toutes les interactions pouvant empêcher l'arrivée de la particule sur le site cible ⁽⁷²⁾.

Les transporteurs peuvent être de deux natures : nanoparticules magnétiques de type Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou un polymère au sein duquel ces nanoparticules sont fixées. D'un réel intérêt, ces nanoparticules font l'objet de nombreuses recherches avec notamment le développement de nouvelles molécules pour le revêtement, ou encore des métaux nobles en tant que noyaux métalliques tel le cobalt, le nickel et l'or ⁽⁶¹⁾.

2.3.2/ Essais cliniques

Utilisées pour transporter des molécules cytotoxiques comme la doxorubicine au sein de sarcomes implantés sur des rats. Les résultats sont encourageants avec une rémission totale par rapport aux rats ayant reçu dix fois la dose mais sans transporteurs. Depuis cette méthode fait l'objet de nombreux essais sur divers animaux comme le rat ⁽⁶⁶⁾, le lapin ⁽⁴⁾, le porc. Cette technique a aussi été employée dans le traitement de tumeurs cérébrales, dont l'accès est particulièrement difficile, du fait de la barrière hémato-méningée. Puffer et Gallo ont ainsi

démontré que des nanoparticules de 1-2 μm pouvaient être concentrées dans une tumeur intracérébrale chez le rat.

De tels essais sont encore rares chez l'homme, un essai de phase I mené par Lubbe a démontré que ces nanoparticules sont bien tolérées sur la plupart de ses patients ⁽⁶⁶⁾.

Cependant des problèmes essentiellement techniques, ne permettent pas le développement d'applications majeures chez l'homme. Pour obtenir une concentration suffisante en nanoparticules en un site donné, le champ magnétique appliqué doit exercer une force sur les nanoparticules supérieure à celle du flux sanguin. Le succès de la technique va donc dépendre de l'intensité du champ magnétique. Or il a été démontré que la plupart des champs magnétiques construits ne sont pas suffisamment puissants, ne permettant une manipulation des nanoparticules *in vivo* qu'à quelques centimètres de l'aimant ⁽⁶⁶⁾. Une application sur un tissu profond ne peut donc pas encore être envisagée.

D'autres problèmes restent à résoudre, risque d'embolisation dans les vaisseaux par accumulation des nanoparticules métalliques, contrôler la libération de la molécule active car si elle est libérée trop tôt elle n'est pas retenue par le champ magnétique et va quitter le site où l'on souhaite son action.

2.4/ Utilisation en tant que générateurs d'énergie thermique

Le but de la recherche en thérapeutique cancéreuse est d'aboutir à une technique permettant la destruction des cellules cancéreuses sans effets sur les cellules saines. Cependant les procédures utilisées comme la chimiothérapie, la radiothérapie ou la chirurgie ne permettent pas de répondre à cette condition. Ce pourrait être le cas avec l'hyperthermie. La possibilité de traiter des tumeurs par un traitement thermique a fait l'objet de nombreux essais cliniques.

Le potentiel d'une telle technique est basé sur la sensibilité des cellules tumorales aux températures modérément élevées ($> 41^\circ\text{C}$) ^(19,51,52). Plusieurs dispositifs pour l'application du traitement thermique ont été cités précédemment, mais une autre technique fait l'objet d'importantes recherches ^(38,45,51) : l'utilisation de nanoparticules métalliques.

2.4.1/ Généralités – principe

Les premières expérimentations eurent lieu en 1957, Gilchrist et al. ont fait subir des traitements thermiques à plusieurs types cellulaires en utilisant des nanoparticules de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) exposées à un champ magnétique de 1,2 MHz ⁽⁵⁰⁾.

Depuis les essais cliniques se sont multipliés, utilisant différents types de nanoparticules, de champs magnétiques d'intensité et fréquence variables et différentes méthodes d'administration des nanoparticules.

De manière générale, la méthode consiste en une application des nanoparticules sur le site à traiter, puis l'application d'un champ magnétique alternatif d'intensité et fréquence suffisantes pour induire un échauffement des nanoparticules et par conséquent des tissus pathologiques l'entourant.

Ce traitement thermique (42°C pendant au moins 30 min) va permettre une destruction du tissu tumoral sans affecter les tissus sains (Cf. fig. n° 20) ⁽⁶⁾.

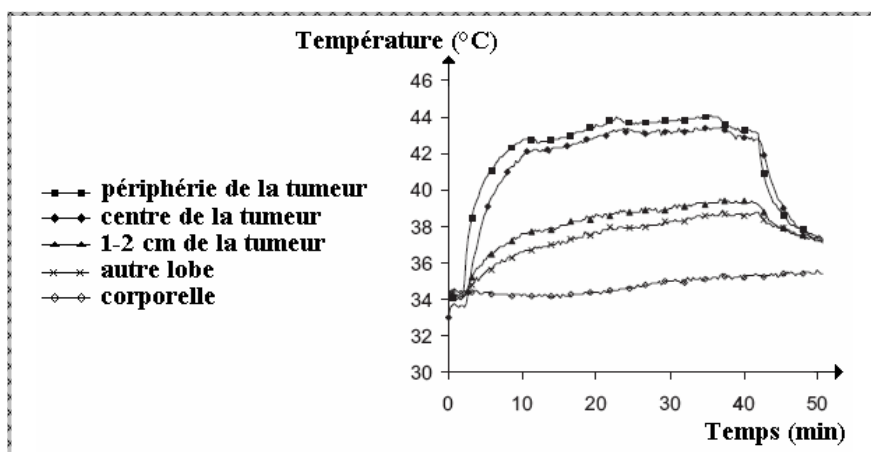


Figure n° 20 : Essai clinique sur des lapins montrant l'échauffement préférentiel de la tumeur lors de l'injection de nanoparticules ferromagnétiques. Représentation des courbes de température au cours du traitement selon la localisation (d'après 75).

2.4.2/ Mécanismes – méthodes

Il est important de comprendre par quels mécanismes l'énergie thermique est produite. Pour ce faire, nous allons remettre en situation les propriétés énoncées précédemment.

L'hyperthermie thérapeutique n'est valable que si l'on parvient à chauffer à 42 °C pendant 30 min au moins les tissus pathologiques. Cependant le calcul de l'énergie à fournir pour un tel échauffement reste difficile à évaluer et à reproduire de par les paramètres variables à prendre en compte comme le débit sanguin et la perfusion tissulaire qui augmentent au cours du traitement et sont des causes de refroidissement. Malgré des analyses menées sur les transferts thermiques, une règle empirique admet que l'énergie à fournir doit être de 100 mWcm⁻³ de tissu pour une action thérapeutique^(56,75).

De plus l'intensité et la fréquence du champ magnétique externe utilisées sont limitées par les effets néfastes sur l'organisme. En effet en réponse à des champs magnétiques de haute fréquence, on a une stimulation des muscles squelettiques, une possible stimulation cardiaque avec arythmie et un échauffement des tissus non spécifique⁽¹¹⁾.

Par conséquent les valeurs utilisables en médecine sont de l'ordre de : $f = 0,05 - 1,2$ MHz et $H = 0-15$ KAm-1.

L'échauffement dépend :

- de la quantité de matériel ferromagnétique accumulée sur le site à traiter, cela est fonction de la voie d'administration. L'injection intra tumorale permet une quantité locale supérieure aux autres voies. On peut considérer que 5-10 mg de nanoparticules métalliques par cm³ de tissu tumoral permettent un traitement thermique chez l'homme.
- de la nature des nanoparticules, les plus utilisées étant des oxydes de fer (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de par leurs propriétés magnétiques et leur biocompatibilité. Elles sont de taille égale ou inférieure à 10 μm , encapsulées ou en suspension dans un solvant afin de faciliter leur accumulation dans un tissu donné. Plus généralement les nanoparticules métalliques peuvent être divisées en 2 classes, les ferromagnétiques ou ferrimagnétiques et les superparamagnétiques, avec des mécanismes générateurs d'énergie thermique spécifiques combinant avantages et inconvénients.

L'explication de ces mécanismes s'appuie sur les propriétés énoncées précédemment. Les nanoparticules ferromagnétiques possèdent des propriétés d'hystérésis lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique variable dans le temps, ce qui conduit à la production d'énergie thermique. Cette énergie est évaluée par la fréquence que multiplie l'aire sous la courbe d'hystérésis.

$$P_{\text{FM}} = \mu_0 f \oint H \, dM.$$

Cette formule ignore l'énergie induite par les courants de Eddy et la résonance ferromagnétique, mais ils sont négligeables dans ce contexte, les particules étant trop petites et la fréquence du champ magnétique trop faible. Dans cette équation, la fréquence n'étant pas dans l'intégrale, la quantité d'énergie produite peut-être mesurée par la mesure de l'aire sous la courbe d'hystérésis, avec un VSM ou SQUID magnétomètre ⁽⁷⁵⁾. Ce sont les dispositifs les plus sensibles pour la mesure des champs magnétiques, en fait ils ne permettent pas de mesurer un champ mais plutôt sa variation. De plus l'énergie P_{FM} maximum est obtenue pour une courbe d'hystérésis rectangulaire, ce qui n'est possible qu'avec un ensemble de particules uni axiales parfaitement alignées avec le champ magnétique, ce qui est impossible *in vivo*. L'énergie maximum que l'on peut obtenir n'est que de 25 % de cet idéal ⁽⁷⁵⁾.

L'intérêt se porte donc vers d'autres particules, les nanoparticules superparamagnétiques utilisées en suspension, on parle de "ferro-liquide" ^(41,50,51,52).

A l'arrêt du champ magnétique, l'aimantation du "ferro-liquide" redevient nulle par le phénomène de relaxation de Brown et de Néel. Chacun de ces processus est caractérisé par le temps de relaxation τ_B et τ_N , τ_B dépendant des propriétés hydrodynamiques de la suspension et τ_N de l'anisotropie des nanoparticules.

Ces deux processus coexistent dans une suspension alors que seule la relaxation de Brown persiste si la nanoparticule est fixée (pas de rotation physique possible).

La quantification de l'énergie thermique dégagée par ces nanoparticules est notée : taux d'absorption spécifique (Specific Absorption Rate, SAR en terminologie anglaise) exprimée en Wg^{-1} . Ce paramètre décrit l'énergie convertie en chaleur par unité de temps et de masse ⁽³⁷⁾. En multipliant le SAR par la densité de la particule on peut comparer P_{FM} et P_{SPM} . Un tel paramètre permet de visualiser l'efficacité des particules quelle que soit leur taille ⁽³⁷⁾. De ces études, on peut déduire que l'utilisation des nanoparticules ferromagnétiques nécessite un champ magnétique d'intensité d'au moins de $100 KAm^{-1}$, alors que pour les nanoparticules superparamagnétiques elle est très inférieure ⁽⁷⁵⁾.

Par exemple, le meilleur rapport d'intensité appliquée/énergie dégagée a été obtenu par Hergt et al. avec un SAR de $45 Wg^{-1}$ à $6,5 KAm^{-1}$ et 300 KHz, soit par extrapolation $209 Wg^{-1}$ pour $14 KAm^{-1}$ ⁽³⁷⁾. Comparativement le meilleur rapport pour les nanoparticules FM est de $75 Wg^{-1}$ à $14 KAm^{-1}$.

2.4.3/ Essais cliniques

A la lecture des divers essais cliniques, deux approches différentes se distinguent. Une première basée sur l'utilisation de températures allant de 45-47°C nommée hyperthermie magnétique. Celle-ci est régulièrement associée avec la chimiothérapie ou radiothérapie, rendant les cellules plus sensibles à ces traitements ⁽³⁴⁾. La seconde, utilise des températures de l'ordre de 43 à 55°C, plus élevées elles ont un effet cytotoxique sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules normales. On parle de thermoablation magnétique. Les effets délétères sur les cellules normales peuvent être réduits par une injection intra tumorale ^(40,50,51).

Ces paramètres sont mesurés *in vitro*, mais est-il possible de les appliquer *in vivo* ? Les cellules absorbent-elles suffisamment de nanoparticules pour que l'énergie dégagée par ces dernières permette la destruction de la cellule ?

Le terme d'hyperthermie intracellulaire a été introduit par Gordon en 1979 ⁽³⁴⁾, mais des études plus récentes démontrent que ce terme est inadéquat. Il s'agirait plus tôt d'hyperthermie extracellulaire ⁽⁷⁷⁾. Jordan et al. a ainsi démontré que les particules absorbées par une cellule étaient insuffisantes pour permettre sa destruction ⁽⁵⁴⁾. De plus l'absorption est très hétérogène, selon cette étude plus de 70 % des cellules ne contiennent pas assez de particules pour le traitement thermique. Il ne s'agit donc pas d'hyperthermie intracellulaire mais d'hyperthermie extracellulaire ^(42,54,75). Néanmoins une cytotoxicité accrue est observée pour les cellules contenant des nanoparticules, mais cela est du aux effets chimiques comme le stress oxydatif avec la formation de radicaux hydroxyle et d'ions ferriques, et aux effets mécaniques (vibrations, rotations) altérant les organites de la cellule ^(11,53,75).

La réussite de tels traitements nécessite non seulement la mise au point de nanoparticules adaptées, mais aussi d'applicateurs pour le champ magnétique. Celui-ci est produit par un courant alternatif appliqué à une structure type anneaux métalliques ou noyaux métalliques.

Dans le cadre de l'hyperthermie, ce champ magnétique doit présenter plusieurs caractéristiques :

- homogène sur une surface importante
- intensité et fréquence précises
- ne pas présenter un danger pour le patient

Si pour des essais sur de petits animaux, la construction de tels champs magnétiques ne pose pas de problème, il n'en est pas de même pour des applications chez l'homme. Pour obtenir les mêmes caractéristiques le besoin en énergie est très important et ne permet pas de travailler dans des conditions sûres à l'heure actuelle.

De plus l'homogénéité du champ est très importante car on doit aimanter chaque particule qui à un SAR spécifique pour obtenir un échauffement homogène. Un tel cahier des charges n'a pu être rempli qu'en 2000, avec la mise au point du seul système opérationnel. Il s'agit d'un prototype construit à Berlin (Cf. fig. n° 21), un applicateur constitué d'un noyau de ferrite opérant à des fréquences de 100 kHz et des intensités de 0 à 15 kAm⁻¹, et possédant une ouverture de 30-45 cm.



Schéma n° 21 : prototype du système permettant l'application d'hyperthermie (MFH Hyperthermie système GmbH, Berlin, Allemagne). Le champ magnétique produit est perpendiculaire à l'axe du patient (1). Il s'agit d'un noyau de ferrite (2) délivrant un champ magnétique de fréquence 100kHz et intensité réglable de 0 à 15 kAm⁻¹, le système est refroidi par air (4). L'ouverture (3), la température et d'autres paramètres sont surveillés et réglés par un opérateur devant l'unité centrale (5). La température est mesurée de manière invasive par une méthode fluoroptique à plusieurs endroits (6) (d'après 51).

3. Etude expérimentale

3.1/ But de l'expérimentation

Le but de l'étude est d'évaluer la pénétration intracellulaire des nanoparticules dans un tissu contenant des éléments cellulaires du tissu osseux, de nombreuses cellules en mitoses et un remodelage tissulaire important. Plus précisément d'étudier les interactions entre les nanoparticules et les ostéoblastes, ostéoclastes et les cellules du système immunitaire. On pourra évaluer s'il y a eu un déplacement passif des nanoparticules et le cas échéant où va-t-on les trouver par rapport au site d'implantation. Un autre phénomène devra être évalué : la dégradation des nanoparticules.

En effet ces deux paramètres doivent être connus, l'un pour éviter des traiter des zones non souhaitées et l'autre pour être le plus efficace possible, les nanoparticules dégradées perdant leurs propriétés magnétiques.

Deux phénomènes peuvent contribuer à la migration des nanoparticules : le premier est que les cellules cancéreuses peuvent migrer par différents processus : extension, embolisation dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le second est que les cellules circulantes comme les macrophages, les cellules géantes, les lymphocytes B et cellules dendritiques qui ont des propriétés phagocytaires et participent à la réaction tissulaire en présence de corps étrangers. A l'intérieur de ces cellules les nanoparticules peuvent migrer jusqu'aux nœuds lymphatiques drainant la région mais aussi le foie, la rate et les poumons.

Afin de ne pas perdre les nanoparticules, elles ont été placées dans une chambre en titane. Ce dispositif est ensuite mis en place dans le condyle fémoral d'une brebis. La chambre présente un tunnel ouvert aux deux extrémités par lesquelles peut pénétrer un tissu de cicatrisation qui va ainsi arriver au contact des particules. Ce système présente l'avantage de ne pas perdre les particules et de présenter une zone d'étude histologique excessivement bien délimitée.

3.2/ Protocole expérimental

3.2.1/ Matériel

3.2.1.1/ Les animaux

Afin d'étudier le comportement des particules *in vivo* trois brebis adultes de race Lacaupe ont été utilisées. Ainsi deux brebis ont été utilisées pour chaque échantillon. Une quatrième brebis ne faisant pas partie de l'expérimentation a été ajoutée au groupe dans un souci de respect du bien être animal (étant donné le comportement social grégaire de ces animaux). Elles ont été maintenues dans des box deux par deux et nourries et abreuvées *ad libitum*.

3.2.1.2/ Les chambres en titane

Le dispositif utilisé pour contenir les nanoparticules est une chambre en titane (Cf. fig. 22-23), fréquemment employée dans le domaine de la recherche en biomatériaux pour le tissu osseux ^(32,33). Le titane inséré dans l'os est un matériel inerte et amagnétique. Il n'entraîne pas de réaction immunitaire et est donc incapable de retenir les particules dans les chambres. Ces chambres se présentent sous la forme d'une vis cylindrique de 5 mm de diamètre et de 8 mm de haut. La structure du cylindre rappelle celle d'un pas de vis permettant une mise en place plus aisée et une stabilité accrue.

La vis est percée par un tunnel transversal et le centre de la vis peut être enlevé pour ouvrir le tunnel et introduire les particules. Environ 0,1 mg de particules ont été disposés dans les tunnels avant de les stériliser à l'autoclave. Au total six chambres ont été utilisées contenant trois types de nanoparticules. De plus l'utilisation de ce dispositif permet une localisation aisée du matériel pour l'étude histologique.

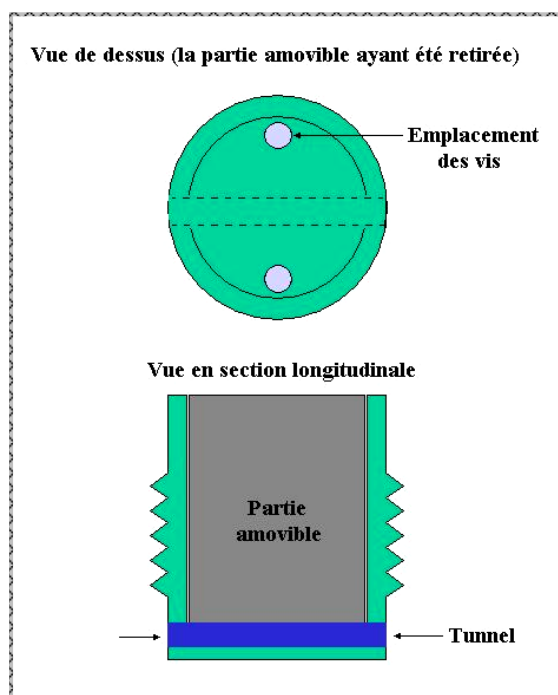


Figure n° 22 : schéma d'une chambre de titane et de son tunnel dans lequel pénètre le tissu de cicatrisation.



Figure n° 23 : Chambre en titane entièrement démontée sur laquelle on peut observer le tunnel creusé dans la partie amovible.

3.2.1.3. Les nanoparticules de fer

Les nanoparticules d'oxyde fer utilisées, développées par le partenaire industriel, sont constituées à 99% de Fe_3O_4 . Leur structure est polyédrique. Trois tailles sont testées : 70, 150 et 500 nm et 0,1 mg est introduit dans chaque chambre. *In vitro* ces nanoparticules sont phagocytées par des cellules métastatiques d'adénocarcinome, leur nombre dépend de leur taille. Ces nanoparticules n'ont démontré aucune toxicité cellulaire. Les produits de la dégradation de l'oxyde de fer sont connus et ne présentent pas de toxicité et sont facilement éliminés par l'organisme. Les autres données techniques devant rester confidentielles selon le fabricant et le partenaire industriel.

3.2.2/ Méthodes

3.2.2.1/ L'implantation animale

L'implantation des chambres de titane au sein des condyles fémoraux latéraux est un acte chirurgical effectué dans des conditions d'asepsie similaires. L'anesthésie des brebis a été effectuée comme suit : induction au thiopental sodique préparé extemporanément (Nesdonal[®], Merial S.A.) à la posologie de 15 mg/kg par voie veineuse. Les animaux ont été ensuite intubés avec une sonde de 9 mm de diamètre et l'anesthésie entretenue avec un mélange gazeux d'oxygène et d'halothane (Halothane[®] vétérinaire Belamont) entre 1.5 et 2.5 %.

L'asepsie du site chirurgical a été obtenue par cinq applications successives et alternées de polyvidone iodée (Vétedine[®] savon, Vétoquinol) et alcool à 75° ; enfin on a appliqué de la polyvidone iodée solution (Vétedine[®] solution, Vétoquinol). Après la mise en place de champs jetables réalisation de la voie d'abord.

Une incision de 3 à 4 cm de long a été pratiquée en prenant pour repères le bord crânial et le bord caudal du condyle latéral. L'incision du plan cutané découvrait le fascia lata qui a été incisé puis la capsule articulaire laissant percevoir le condyle fémoral latéral (Cf. fig. 24 a).

Un trou de 5 mm de diamètre et de 1 à 1,5 cm de profondeur a été réalisé à l'aide d'un foret de 5 mm monté sur un moteur chirurgical (Cf. fig 24 b et c). Si nécessaire, le trou obtenu a été retravaillé à l'aide d'une curette selon un mouvement rotatoire.

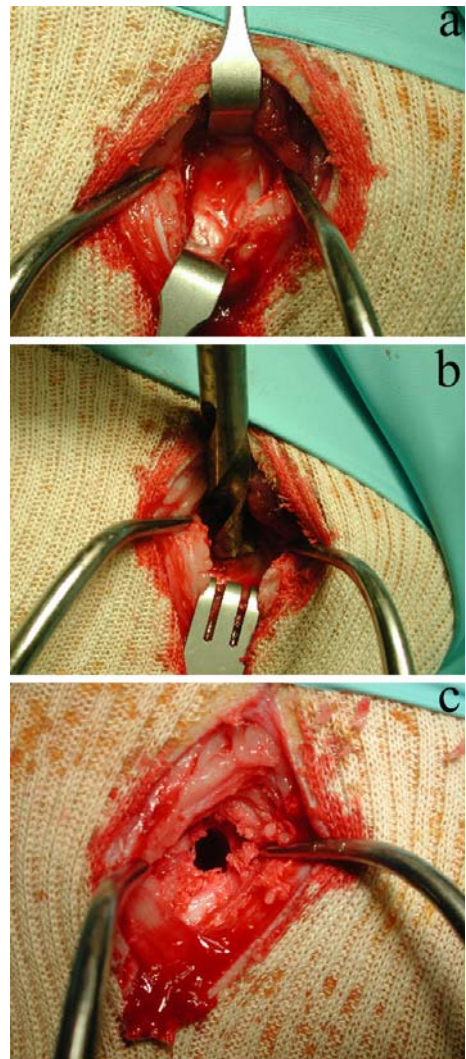


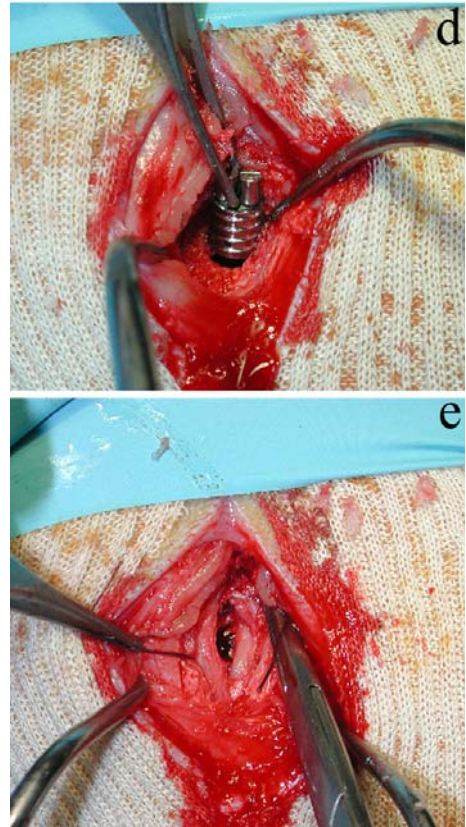
Figure n° 24-a,b,c : Etapes de la mise en place d'une chambre en titane dans le condyle fémoral latéral d'une brebis.

La chambre en titane a alors été mise en place avec précaution pour éviter qu'il n'y ait une fuite prématurée des particules par les orifices du tunnel (Cf. fig. 24 d).

Pour refermer il a été pratiqué une suture capsulaire par surjet simple puis la suture du fascia lata par surjet en U avec un fil tressé résorbable de déc. 3 (Vicryl[®], Janssen Cilag – Division santé animale) (Cf. fig. 24 e). Enfin la suture cutanée a été réalisée par surjet simple avec un fil monobrin non résorbable de déc. 3 (Ethicrin[®], Janssen Cilag – Division santé animale).

Les deux condyles fémoraux latéraux ont été implantés successivement, chaque condyle a reçu une chambre contenant une poudre différente du condyle controlatéral.

Figure n° 24-d,e : Etapes de la mise en place d'une chambre en titane dans le condyle fémoral latéral d'une brebis.



Chaque animal a reçu une injection d'acide tolfénamique (Tolfine[®], Vétquinol) à la posologie de 2,5 mg/kg par voie intramusculaire. Aucune antibioprophylaxie n'a été mise en œuvre compte tenu de la brièveté des interventions. Une fois la brebis réveillée elle a été remise auprès des autres.

3.2.2.2/ Suivi et obtention du matériel à analyser

Les brebis ont été maintenues dans des box deux par deux et nourries et abreuvées *ad libitum*. A deux semaines d'implantation les animaux ont été sacrifiés par overdose de thiopental sodique par voie veineuse. Les chambres ont été retirées et les ganglions lymphatiques poplités et lombo-aortiques ont été prélevés et immédiatement placés dans une solution contenant 2% de glutaraldehyde pendant 2 jours à 4°C. Les fémurs ont été ensuite prélevés dans leur intégralité puis congelés.

3.2.2.3/ Etude histologique

Après fixation, les chambres de titane sont ouvertes et le contenu des tunnels est prélevé et coupé en deux parties égales. Une est déshydratée dans des solutions d'éthanol croissantes pour une étude en microscopie optique et l'autre est fixée dans une solution de 2% de glutaraldéhyde dans du DMEM pour être étudié en microscopie électronique.

La partie à étudier en microscopie optique est incluse dans de l'hydroxyéthylméthacrylate et des coupes de 5 µm ont ensuite été faites. Elles ont été colorées dans une solution de Giemsa.

Les particules ont été mises en évidence par une coloration de Perls : les coupes sont immergées dans une solution de 2% de ferrocyanide de potassium pendant 5 min, puis par une solution de 2% de ferrocyanide mélangées dans un volume égal d'une solution de 2 % d'HCl pour 15 min. Elles ont ensuite été contre colorées avec une solution de rouge neutre.

Afin d'identifier les macrophages et les cellules géantes, l'activité phosphatase acide des cellules a été mise en évidence en utilisant le kit Sigma[®].

Les ganglions lymphatiques des zones drainant le site d'implantation : ganglion poplité et lombo-aortiques ont été prélevés et traités de la même manière afin de les observer en microscopie optique et électronique afin de visualiser des particules ayant migré.

3.2.2.4/ Microscopie électronique à transmission

Après fixation, les échantillons ont été déshydratés dans des solutions croissantes d'acétone. Elles ont ensuite été incluses dans une résine époxy (Epon[®] 812). Des coupes de 200 angströms ont été effectuées avec un ultramicrotome équipé d'une lame en diamant. Elles ont été colorées au plomb et à l'acétate d'uranyle puis examinées à 20 kV dans un microscope à transmission Hitachi[®].

3.3/ Résultats

3.3.1/ Histologie du contenu des chambres

3.3.1.1/ Microscopie optique

Il apparaît, dans tous les échantillons examinés, que de nombreuses particules sont visibles dans tous les échantillons. Les particules visibles sont dispersées dans tout le volume des échantillons. Les particules visibles résultent pour la plupart du temps d'agglomérats. Ceux-ci peuvent avoir une taille de plusieurs dizaines de μm , en particulier pour les échantillons 23 et 9). Il existe, autour des agglomérats, de nombreuses cellules retenant des particules ce qui suggère que ces cellules se sont chargées au contact des agglomérats.

Il existe de nombreuses cellules ayant une activité phosphatase acide (Cf. fig. 25). Elles sont assez régulièrement réparties dans le volume des échantillons. Il est notable que pour l'ensemble des échantillons, la localisation des cellules phosphatase acide c'est à dire ayant une activité macrophagique ne recoupe pas celle des cellules ayant phagocyté des particules.

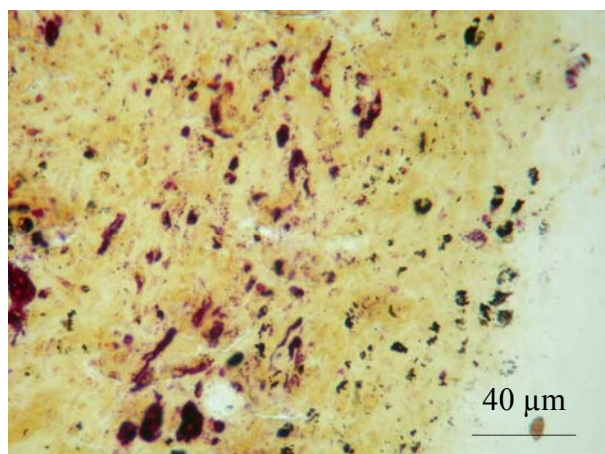


Figure 25: Section du contenu d'une chambre de culture remplie de particules DAH9 (70 nm). De nombreuses cellules contiennent des particules sans marquer une activité phosphatase acide alors que d'autres ayant une activité phosphatase acide en contiennent.

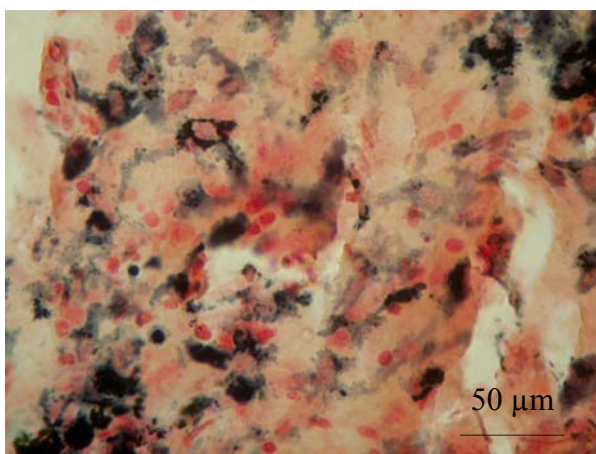


Figure 26: Section du contenu d'une chambre contenant des nanoparticules de 70 nm. Il existe des cellules contenant des particules visibles sous forme de dépôts noirs ainsi que des cellules positives (bleu-gris) à la réaction de Perls et ne contenant pas d'amas visibles en microscopie optique.

Il existe des cellules positives ne contenant pas de particules aussi bien que des cellules positives chargées en particules. La coloration de Perls (fig. 26) montre que certaines des cellules contenues dans les échantillons ne contenant pas d'amas de particules visibles en microscopie optique sont colorées ce qui indique qu'elles contiennent du fer sous forme ferrique.

3.3.1.2/ Microscopie électronique

Sous microscopie électronique, tous les tissus examinés présentaient des cellules chargées en nanoparticules.

3.3.1.2.1/ Particules de 500 nm (fig. 27 et 28)

Dans les chambres de titane, des cellules contiennent des particules. Il semble que toutes les cellules contenant les particules soient proches les unes des autres. Lorsqu'on s'éloigne de ces zones, les cellules ne contiennent pas ou très peu de particules. Les particules sont contenues dans des lysosomes, des phagosomes ou des phagolysosomes. Elles sont généralement isolées ou bien agglomérées dans les mêmes vésicules intracellulaires. La taille des agglomérats est limitée à quelques dizaines de particules et n'excède pas 1 à 2 μm de diamètre.

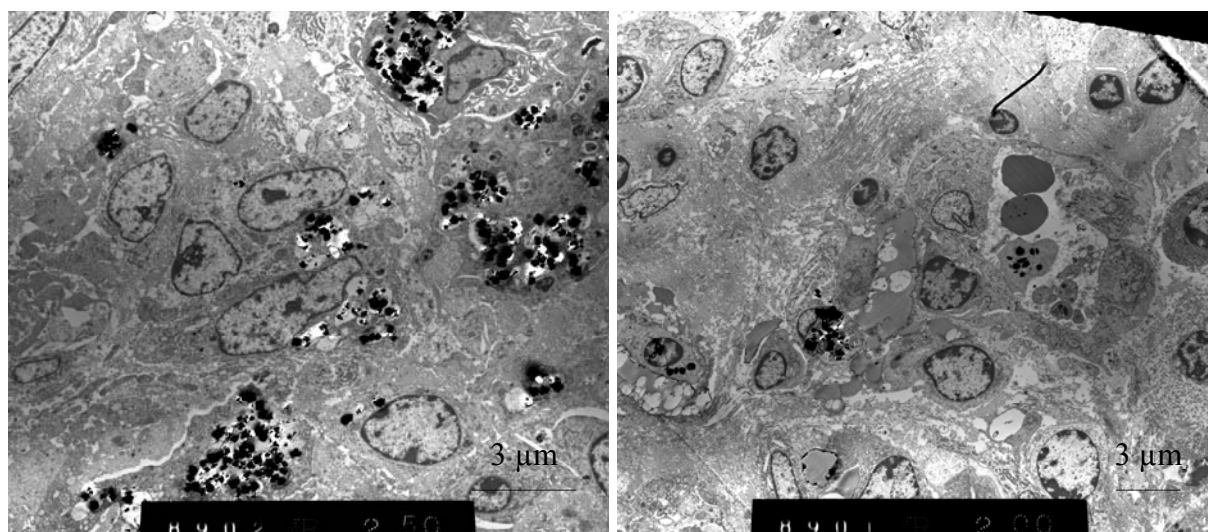


Figure 27a : MET du contenu d'une chambre en titane contenant des particules de 500 nm. Elles peuvent être isolées ou bien agglomérées dans les mêmes vésicules.

Figure 27b : La densité de particules diminue en dehors de certaines zones particulières.

Il peut exister des signes de dégradation dans les lysosomes se manifestant par la libération de débris.

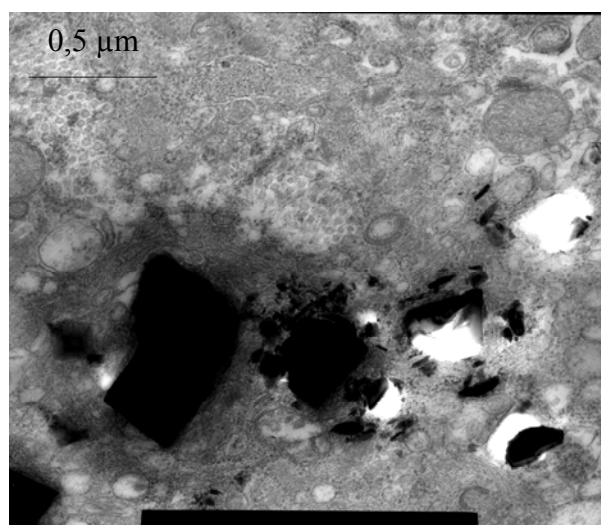


Figure 28 : MET d'un lysosome contenant des particules de 500 nm montrant des particules se corrodant. Des particules de dégradation sont visibles en périphérie.

3.3.1.2.2/ Particules de 150 nm

Les cellules contiennent de nombreuses particules, celles-ci sont bien réparties dans un grand nombre de cellules (fig. 29 et 30). Elles sont réparties dans les cellules sous deux formes qui peuvent cohabiter dans la même cellule : 1/ des petits amas de quelques particules dans des lysosomes, ou bien 2/ des gros amas de plusieurs centaines de particules dans des phagosomes de grandes tailles.

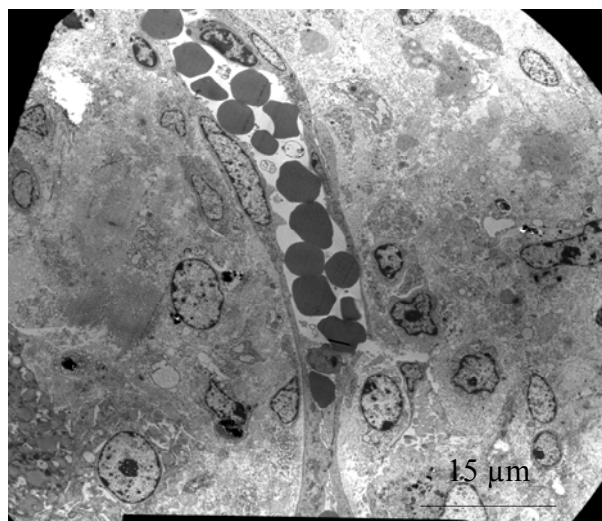


Figure 29: La répartition des particules de 150 nm dans les cellules est assez homogène. De nombreuses cellules contiennent les particules à distance de l'insertion des particules, ici à proximité d'un capillaire.

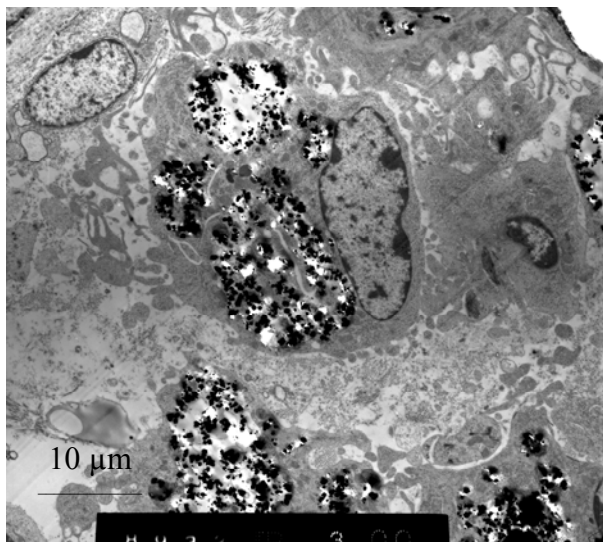
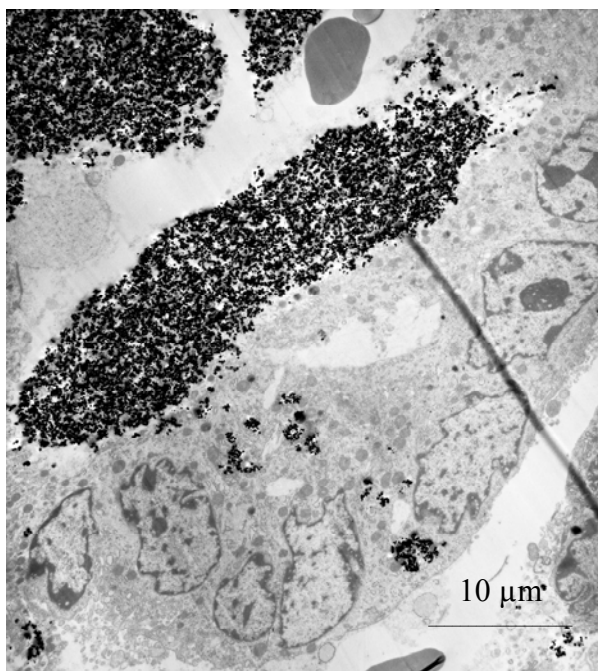


Figure 30: Les particules sont présentes dans les lysosomes sous forme de petits amas ou bien sous forme d'agrégats très importants dans des phagosomes.

3.3.1.2.3/ Particules de 70 nm

Il existe de très gros agrégats extracellulaires de plusieurs dizaines de μm (fig. 31 et 32). Les cellules qui sont au contact de ces macroagrégats ont internalisé des particules sous formes de microagrégats de quelques nanoparticules. Il semble donc que ces cellules soient capables de dissocier les particules.

Figure 31 : Il y a des cellules multinucléées au contact d'agrégats de particules (70 nm) de plusieurs dizaines de μm . L'agrégat est dissocié par les cellules qui internalisent les nanoparticules sous leur forme primaire. Elles contiennent des microagrégats dans leur lysosomes.



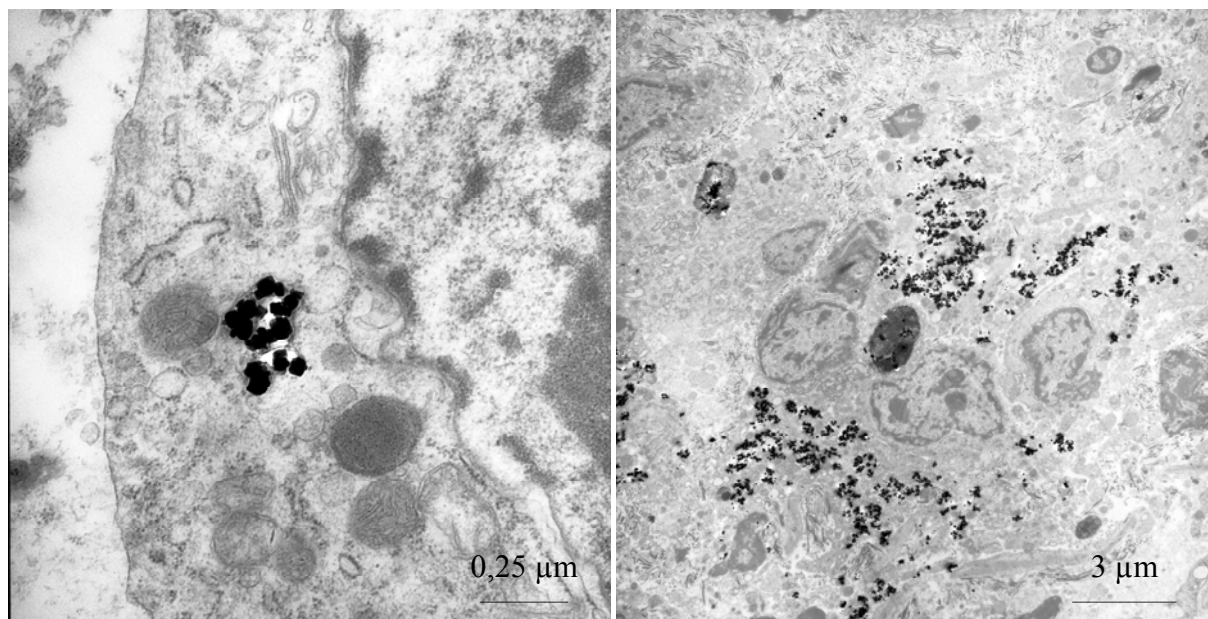
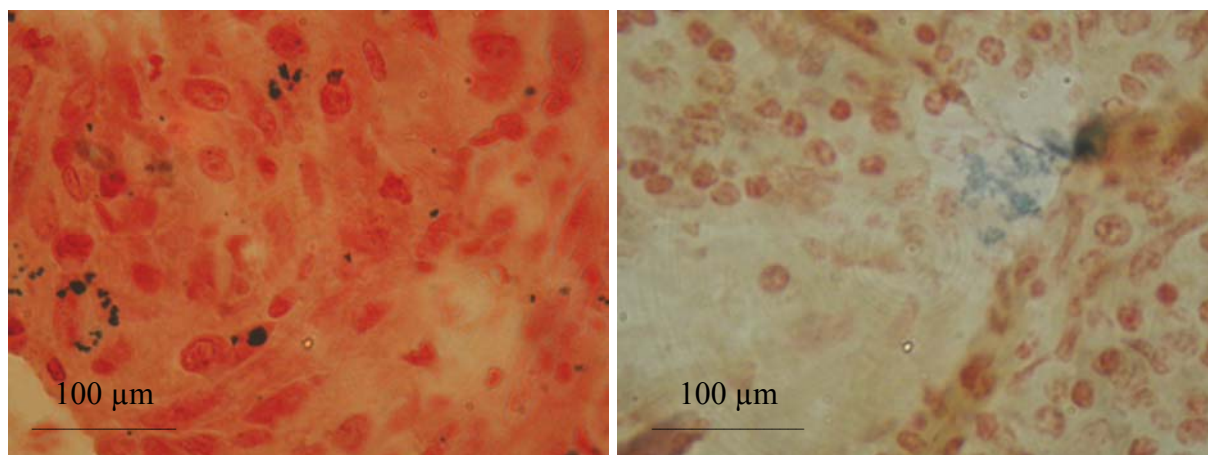


Figure 32 : A l'intérieur des cellules, les nanoparticules sont stockées dans des vésicules (endosomes, lysosomes ou phagolysosomes).

3.3.2/ Histologie des nœuds lymphatiques

3.3.2.1/ Microscopie optique

Les ganglions ne sont pas hypertrophiés. Ils ne présentent pas de discoloration. En microscopie optique, la morphologie des ganglions est respectée et il n'existe pas de prolifération lymphocytaire. Sur les coupes non colorées, on remarque peu de particules de magnétite quelles que soient leur taille (fig. 33a).



**Figure 33 /a: Particules de 150 nm visualisées dans un ganglion poplité.
b/ Cellules contenant du fer sous forme ferrique dans un ganglion identique.**

Sur les coupes colorées par le bleu de Perls, tous les échantillons montrent des migrations dans les ganglions examinés (fig. 33b).

3.3.2.2/ Microscopie électronique

En microscopie électronique à transmission, on retrouve également très peu de cellules contenant des nanoparticules. Celles-ci ne sont sous forme d'agglomérats de petite taille même pour des particules dont les tailles sont responsables d'agréats. Ces particules sont généralement situées dans des zones contenant des macrophages au niveau de la capsule et les sinus sous-capsulaires. Dans un nombre de cas très faible, on en trouve dans des lymphocytes. Les particules quelques soient leur taille d'origine présentent des signes de dégradation très importants. Les particules de plus grande taille peuvent être fragmentées, les plus petites présentent plusieurs signes de dégradation : estompage des bords, disparition des arêtes des particules, arrondissement des particules, diminution de taille.

Quelques que soient les nanoparticules Il n'existe pas de signes de souffrance cellulaire.

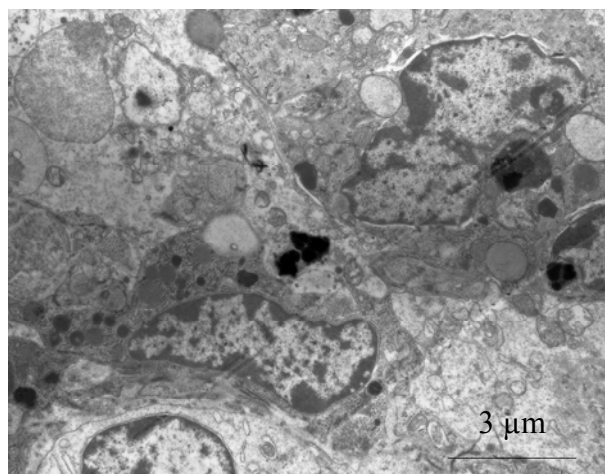


Figure 34 : MET de particules de 500 nm dans un ganglion lombo-aortique.

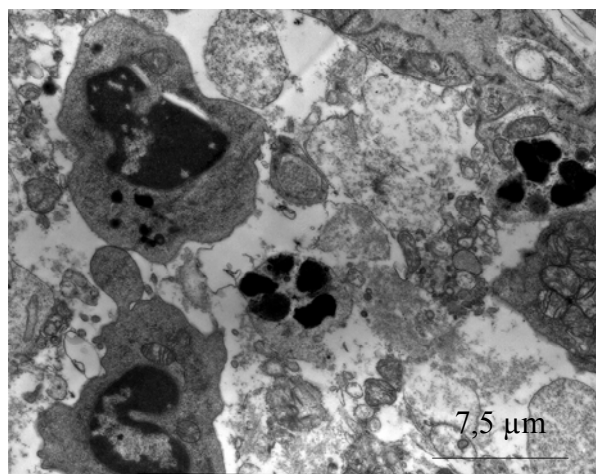


Figure 35 : MET de particules de 150 nm dans les ganglions.

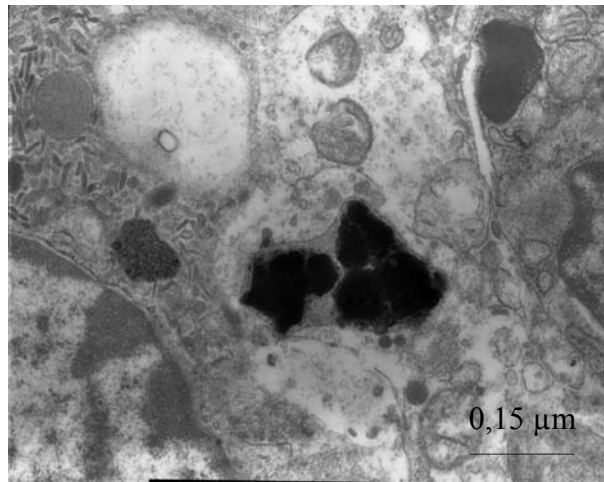


Figure 36 : MET de particules de 70 nm observées dans un lysosome de macrophage de nœud lymphatique. Les nanoparticules présentent une surface irrégulière, modifiée et certaines ont fusionné.

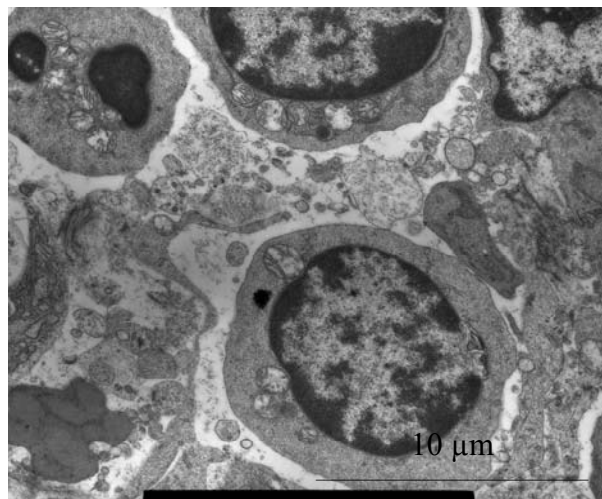


Figure 37 : MET de particules de 70 nm observées dans une vacuole d'un lymphocyte situé dans un NL et présentent des signes de dégradation.

3.4/ Discussion

Les données obtenues lors de cette étude essentiellement qualitatives sont difficilement comparables aux études menées sur ce sujet, tout comme ces dernières entre-elles. En effet les variations protocolaires : nature et composition des nanoparticules (capacités d'agglomération, composition de la surface, structure cristalline), caractéristiques du champ magnétique utilisé (intensité) et le protocole lui-même, rendent la comparaison difficile. Comme cité précédemment ces différences vont conduire à des variations affectant le devenir des nanoparticules au sein de l'organisme vivant et la nature du traitement thermique.

Néanmoins les résultats obtenus vont être discutés et confrontés ici aux études publiées.

Cette étude expérimentale montre que les nanoparticules d'oxyde de fer implantées dans de l'os peuvent migrer après internalisation par diverses cellules. Tout d'abord il est constaté que toutes les cellules, qu'elles appartiennent au système immunitaire ou soient des cellules osseuses ont phagocyté des nanoparticules et ont contribué au déplacement actif de ces dernières quelle que soit leur taille.

Le même constat est effectué dans les diverses études, la plupart des cellules ont la capacité d'intégrer les nanoparticules par divers mécanismes : phagocytose, opsonisation.

Cette intégration peut-être contrôlée par l'adjonction de molécules à la surface des nanoparticules ^(12,71,86,88). Ceci permet d'envisager de choisir des molécules permettant d'adresser les nanoparticules et d'envisager un traitement des cellules tumorales. Cependant cette migration ne présente pas une contre-indication, en effet les quantités de nanoparticules au niveau des sections de nœuds lymphatiques ne permettraient pas un échauffement secondaire.

Les particules intracellulaires sont dans des lysosomes et des phagolysosomes pour les plus grandes. Les conditions physico-chimiques de ce milieu sont très agressives avec un pH acide. Ces conditions peuvent expliquer la dégradation du matériel.

La présence de cellules au contact d'agrégats de nanoparticules ayant internalisé des nanoparticules isolées ou de petits agrégats suggère que les nanoparticules sont internalisées de manière active et que les cellules sont capables de développer une force supérieure à celle les agrégeant.

Il n'est pas observé une réelle réaction à l'encontre de ces corps étrangers comme le montre la distribution homogène de cellules marquées positives à la réaction de Perls qui sont connues comme étant des macrophages. Résultats en accord avec des travaux *in-vitro* au cours desquels une lignée primaire de monocytes est cultivée en présence de nanoparticules. Aucune synthèse de facteurs de l'inflammation (de cytokines et de TGF entre autres) n'a été notée.

La dégradation d'oxyde de fer dans l'organisme peut conduire à plusieurs produits : fragments du matériel primaire, des sels comme le chlorure de fer ou hydroxyde de fer, des complexes de ces sels ou avec des molécules organiques. L'importance attribuée à cette dégradation et à sa localisation est liée à ces conséquences : en effet les produits de la dégradation ne présentent pas de propriétés magnétiques et donc ne vont pas contribuer au traitement d'une zone non souhaitée.

Par ailleurs bien que les trois tailles de nanoparticules testées migrent de l'os jusqu'aux nœuds lymphatiques, cette proportion est très faible et le pourcentage des cellules en contenant infime. L'examen des nœuds lymphatiques démontre la capacité des cellules à se charger en nanoparticules et à les dégrader, retrouvant ainsi du fer ferrique (coloration de Perls positive et microscopie électronique) dans les cellules n'ayant pas de nanoparticules. Les cellules sont donc capables de réaliser un recyclage des nanoparticules. Ces caractères sont communs aux nanoparticules quelle que soit leur taille.

La dégradation des nanoparticules dans les nœuds lymphatiques semble être beaucoup plus rapide qu'au sein du tissu osseux comme le montrent les signes physiques : estompage des bords, disparition des arêtes des particules, arrondissement des particules, diminution de taille. Deux semaines d'implantation est un délai trop court pour une dégradation totale et les nanoparticules ne sont pas stables dans les conditions physico-chimiques au sein des lysosomes.

Parallèlement à ces modifications physiques les propriétés magnétiques sont aussi altérées diminuant les capacités thermiques (SAR) des nanoparticules au cours du temps. Le traitement thermique devra donc être appliqué durant une fenêtre thérapeutique à déterminer.

De même il est probable que ce matériel ne persiste pas dans l'organisme. Cependant tant qu'il persiste le noyau magnétique il est possible de suivre les mouvements des particules

par IRM voire radiologiquement. C'est un fait intéressant lorsqu'il s'agit de tracer des cellules métastatiques avant qu'elles ne forment une tumeur détectable par IRM ou TM.

Aucun signe de toxicité n'est ici rapporté, d'ailleurs la toxicité n'a pu être déterminée pour des nanoparticules ferriques. Pour les nanoparticules recouvertes de dextran une DL 50 a été déterminée sur des souris (DL 50 = 5 g/kg) ⁽¹⁸⁾. Elle est très supérieure aux quantités utilisées dans le cadre de l'hyperthermie. La toxicité serait essentiellement due à ces molécules sur les cellules du système réticulo-hystiocytaire.

La répartition extracellulaire et intracellulaire varie en fonction de la taille, elle est plus homogène pour les nanoparticules de 150 nm que pour celles de 70 ou encore celles de 500 nm. Ce résultat serait la résultante de l'ensemble des forces qui s'exercent sur les nanoparticules : le moment magnétique tend à les rapprocher, l'action des forces électrostatiques est plus complexe. Il en résulte que le diamètre de 150 nm semble être le plus adapté à ce type d'applications. Ces mêmes interactions sont connues pour influencer la clairance des particules par l'organisme ⁽⁴⁵⁾.

L'étude réalisée ici a pour but de déterminer la possibilité de réaliser un traitement hyperthermique par voie locale. La voie locale présente des contraintes différentes de la voie systémique :

- la biocompatibilité ne représente pas une réelle contrainte lors d'application intra tumorale.
- le phénomène d'hyperthermie extracellulaire est majoritaire par rapport à l'hyperthermie intracellulaire ⁽⁷⁷⁾, la zone traitée et donc la température obtenue sera fonction de la distribution spatiale des nanoparticules et de la conductivité du tissu. Dans l'étude menée par Hilger sur du tissu hépatique, une température voisine de la normale est observée au delà de 12 mm du centre des points traités et qu'elle varie selon le tissu ⁽³⁸⁾. Cette notion de distribution spatiale est importante, cependant ce paramètre est peu documenté. Le lessivage des nanoparticules de la zone d'application n'a pas d'intérêt dans les applications systémiques qui font l'objet de nombreuses études. Seules deux études considèrent la biodistribution des nanoparticules après administration intra tumorale ⁽⁴⁵⁾, cette diffusion passive est ainsi évaluée par Hilger à 15 mm.

- l'application des nanoparticules (1 volume de nanoparticules pour 10 volumes de tumeur) entraîne une augmentation de la pression interstitielle risquant d'entraîner la migration de cellules tumorales ⁽⁴⁵⁾.

La modélisation théorique de ce type de traitement semble être proche des résultats obtenus expérimentalement. L'étude menée par Andrä puis par Hilger conclut à un écart entre la théorie et l'expérimentation de 0,7°C ^(1,43). De plus les températures thérapeutiques peuvent être obtenues en 1 à 5 min. ces résultats sont à pondérer par le fait qu'ils sont obtenus *ex-vivo*, ils ne prennent pas en compte la perfusion tissulaire qui influe sur la température résultante. Une application peut donc être envisagée sur des tissus faiblement vascularisés comme le tissu musculaire et le tissu adipeux (tissu mammaire chez la femme).

Conclusion:

Utilisée aujourd'hui dans le cadre d'essais cliniques l'hyperthermie utilisant des nanoparticules métalliques représenterait un choix thérapeutique en oncologie humaine et vétérinaire. Un tel traitement ne sera possible que si l'on est en mesure de maîtriser la distribution cellulaire des nanoparticules dans l'organisme. Or d'après les résultats obtenus les nanoparticules métalliques sont retrouvées au sein de toutes les cellules en division et par extension les cellules tumorales. De plus elles sont essentiellement localisées au site d'application si on considère les nanoparticules dans leur intégrité. Plusieurs facteurs restent à contrôler et à explorer. Le comportement magnétique des agrégats de nanoparticules est-il identique à celui des particules elles-mêmes ? Permettrait-il un échauffement suffisant des tissus ?

Dans l'optique de l'application d'une telle thérapeutique la mise au point de dispositifs permettant une administration et une distribution optimales doit faire l'objet de progrès techniques. Serait-il possible d'adresser les nanoparticules comme lors d'administrations systémiques ?

L'hyperthermie est une thérapeutique encore à l'état de l'exploration et de la mise au point dont une application à plus grande échelle n'est pas envisageable à l'heure actuelle. Par contre il est bien évident que les investigations doivent être conduites pour identifier les possibilités de déplacer (via un champ magnétique) des particules extracellulaires d'un site donné vers une aire pathologique, ou de les y concentrer après une administration systémique.

D'autres champs d'exploration tels que le marquage des particules avec des ligands spécifiques de types cellulaires propres aux tumeurs osseuses, rendant leur fixation sélective, doivent être largement étudiés de façon à optimiser et à élever le rendement d'un traitement par hyperthermie.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

M. DA SILVA SANTOS Vasco

a été admis(e) sur concours en : 2000

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : **03 JUIN 2004**

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, D. MATHON, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

M. DA SILVA SANTOS Vasco

intitulée :

« Etude de la diffusion de nanoparticules ferromagnétiques dans le fémur du mouton. Application au traitement de tumeurs osseuses »



**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Didier MATHON**

**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Paul BONNEVIALLE**

**Vu le : 10/ JUIN 2004
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Bibliographie :

- (1) ---- Andrä W, d'Ambly CG, Hergt R, et al.
Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia.
J Magnetism Magnetic Materials 1999; 194:197-203
- (2) ---- Akagi M, Tsuboyama T, Ikenaga M, Matsusue Y, Hiraoka M, Nakamura T.
Anti-tumour effects of localized hyperthermia on an experimental bone tumour using an intramedullary nail.
Int J Hyperthermia. 1997 Jul-Aug;13(4):387-400.
- (3) ---- Akerman M, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E.
Nanocrystal targeting in vivo.
PNAS October 1, 2002, 99(20):12617-12621
- (4) ---- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C et al.
Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting.
Cancer Research 2000, December 1, 60:6641-6648
- (5) ---- Aspenberg P, Tagil M, Kristensson C, Lidin S.
Bone graft proteins influence osteoconduction. A titanium chamber study in rats.
Acta Orthop Scand. 1996 Aug;67(4):377-382
- (6) ---- Babincova M, Leszczynska D, Sourivong P, Babinec P.
Selective treatment of neoplastic cells using ferritin-mediated electromagnetic hyperthermia.
Med Hypoth 2000;54(2): 177-179
- (7) ---- Balogh L et al.
Veterinary nuclear medicine. Scintigraphical examinations – A review.
Acta Vet Brno 1999, 68: 231-239
- (8) ---- Berg J, Weinstein MJ, Schelling SH, Rand WM.
Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb sparing surgery: 22 cases (1987-1990).
J Am Vet Med Assoc, 1992, 200: 2005
- (9) ---- Berg J, Weinstein MJ, Springfield DS and Rand WM.
Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma.
J Am Vet Med Assoc, 1995, 206(10): 1555-60
- (10) ---- Bergman PJ, MacEwen EG, Kurzman ID, Henry CJ, Hammer AS, Knapp DW, Hale A, Kruth SA, Klein MK, Klausner J, Norris AM, McCaw D, Straw RC, Withrow SJ.
Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993).
J Vet Intern Med 1996, 10: 76.
- (11) ---- Berry C, Curtis ASG.
Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Topical review.
J Phys D: Appl Phys 2003, 36: 198-206.
- (12) ---- Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis ASG.
Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro.
Biomaterials 24; 2003 4551-4557
- (13) ---- Bettge M, Chatterjee J, Haik Y.
Physically synthesized Ni-Cu nanoparticles for magnetic hyperthermia
Biomagnetic Research and Technology

- (14) ---- Billotey C, Wilhelm C, Devaud M, Bacri J-C, Bittoun J, Gazeau F.
Cell internalisation of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging.
Magn Reson Med 2003 Apr;49(4): 646-654
- (15) ---- Bitetto WV, Patnaik AK, Schrader SC, Mooney SC.
Osteosarcoma in cats : 22 cases (1974-1984).
J Am Vet Med Assoc, 1987, 190(1):91-93
- (16) ---- Boehm T, Malich A, Goldberg SN, Reichenbach JR, Hilger I, Hauff P, Reinhardt M, Fleck M, Kaiser WA.
Radio-frequency tumor ablation: internally cooled electrode versus saline-enhanced technique in an aggressive rabbit tumor model.
Radiology 2002 Mar; 222(3):805-813
- (17) ---- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P.
Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Review.
Adv Drug Deliv Rev. 2002 Sep 13;54(5):631-51.
- (18) ---- Brusentsov NA, Kuznetsov VD, Brusentsova TN, Gendler TS, Novakova AA, Volter ER, Haliulina EA, Danilkin MI.
Magnetisation of ferrofluids and effects of intracellular deposition of ferrite nanoparticles.
J Magn Magn Mater 2004, 272-276: 2350,2351
- (19) ---- Cavaliere R, Ciocatto EC, Giovanella BC, Heidelberger C, Johnson RO, Margottini M, Mondovi B, Moricca G, Rossi-Fanelli A.
Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies.
Cancer. 1967 Sep;20(9):1351-81.
- (20) ---- Chan DCF, Kirpotin D, Bunn PA.
Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron-oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer.
J Magn Magn Mater 1993;122:374-378
- (21) ---- Chun R, de Lorimier LP.
Update on the biology and management of canine osteosarcoma.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2003, 33(3): 491-516.
- (22) ---- Cooley DM, Waters DJ.
Skeletal neoplasms of small dogs: a retrospective study and literature review.
J Am Anim Hosp Assoc, 1997, 33: 11-23
- (23) ---- Davis GJ, Kapatkin AS, Craig LE, Heins GS, Wortman JA.
Comparison of radiography, computed tomography and magnetic resonance imaging for evaluation of appendicular osteosarcoma.
J Am Vet Med Assoc. 2002, 15; 220(8): 1171-1176.
- (24) ---- Delepine N, Alkallaf S, Cornille H, Markowska B, Delepine G.
Progress and stagnation in chemotherapy protocols for primary osteosarcoma.
Ann Med Interne (Paris). 2003 Feb;154(1):12-24. French.
- (25) ---- Dernell WS.
Limb-sparing surgery for dogs with bone neoplasia.
In: SLATTER D. Textbook of small animal surgery, WB SAUNDERS Company, Philadelphia, 3rd ed., 2003, 2272-2284.
- (26) ---- Dernell WS.
Tumors of the skeletal system.
In: DOBSON JM, LASCELLES BDX. BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology. 2nd ed, 2003:179-195.

- (27) ---- Dobson JM.
Radiation therapy, Hyperthermia, Immunotherapy.
In: Manual of small animal oncology, ed. by White R.A.S., BSAVA, 1991, 161-183
- (28) ---- Ettinger SJ, Feldman EC.
Textbook of veterinary internal medicine, diseases of the dog and cat. WB SAUNDERS Company,
5th ed., 1999, 1996p.
- (29) ---- Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer & Société Française d'Oncologie
Pédiatrique. Standards, options et recommandations pour le diagnostic, le traitement et la surveillance
de l'ostéosarcome. 1999 48p.
- (30) ---- Fossum TW.
Small Animal Surgery. Mosby, 3rd ed. 2002: 1014-1025
- (31) ---- Garzotto C, Berg J.
Musculoskeletal system.
In: SLATTER D. Textbook of small animal surgery, WB SAUNDERS Company, Philadelphia, 3rd
ed., 2003, 2460-2474
- (32) ---- Goodman S, Aspenberg P.
Effect of amplitude of micromotion on bone ingrowth into titanium chambers implanted in the rabbit
tibia.
Biomaterials 1992, 13(13);944-948
- (33) ---- Goodman S, Aspenberg P, Song Y, Regula D, Lidgren L.
Polyethylene and titanium alloy particles reduce bone formation. Dose-dependance in bone harvest
chamber experiments in rabbits.
Acta Orthop Scand. 1996 Dec;67(6):599-605
- (34) ---- Gordon RT, Hines JR, Gordon D.
Intracellular hyperthermia. A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature
and biophysical alterations.
Med Hypothesis, 1979 Jan; 5(1): 83-102
- (35) ---- Gupta PK, Hung CT.
Magnetically controlled targeted micro-carrier systems.
Life sciences 1989, 44; 175-186.
- (36) ---- Haure D.
L'hyperthermie locale modérée provoquée : bases biologiques, technologiques et procédurales pour
une application pratique rationnelle en thérapeutique anticancéreuse.
Th. D : Toulouse, 1998-TOU 3-4112, 461p.
- (37) ---- Hergt R, Andrä W, d'Ambly CG, Hilger I et al.
Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles
IEEE Transactions on Magnetism 1998;34,5:3745-3754.
- (38) ---- Hiergeist R, Andrä W, Buske N et al.
Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia.
J Magn Magn Mater 1999;201:420-422
- (39) ---- Hilger I, Andra W, Bahring R, Daum A, Hergt R, Kaiser WA.
Evaluation of temperature increase with different amounts of magnetite in liver tissue samples.
Invest Radiol. 1997 Nov; 32 (11): 705-712.
- (40) ---- Hilger I, Andrä W, Hergt R, Hiergeist R, Schubert H, and kaiser WA.
Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in
human cadavers and mice.
Radiology 2001; 218:570-575

- (41) ---- Hilger I, Frühauf K, Andrä W, Hiergeist R, Hergt R and kaiser WA.
Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology.
Acad Radiol 2002; 9:198-202
- (42) ---- Hilger I, Frühauf S, Linß W, Hiergeist R, Andrä W, Hergt R and kaiser WA.
Cytotoxicity of selected magnetic fluids on human adenocarcinoma cells.
J Magn Magn Mater
- (43) ---- Hilger I, Hergt R and kaiser WA.
Effects of magnetic thermoablation in muscle tissue using iron oxide particles: an in vitro study.
Invest Radiol. 2000 Mar; 35 (3): 170-179.
- (44) ---- Hilger I, Hergt R and kaiser WA.
Towards breast cancer treatment by magnetic heating
J Magn Magn Mater
- (45) ---- Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H and kaiser WA.
Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study.
Invest Radiol 2002 Oct; 37 (10): 580-586.
- (46) ---- Hofer KG.
Hyperthermia and cancer.
European Cells and Materials 2002 3(2): 67-69.
- (47) ---- Holt D, Van Winkle T, Schelling C, Prymak C.
Correlation between thoracic radiographs and post-mortem findings in dogs with hemangiosarcoma:
77 cases (1984-1989).
J Am Anim Hosp Assoc, 1992, 200 (10): 1535-39.
- (48) ---- Ikenaga M, Ohura K, Yamamuro T, Kotoura Y, Oka Masanori, Kokubo T.
Localized hyperthermic treatment of experimental bone tumors with ferromagnetic ceramics.
J Orthopaedic Res, 1993, 11:849-855
- (49) ---- Ito A, Shinkai M, Honda H, Yoshikawa K, Saga S, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T.
Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia
using magnetite nanoparticles.
Cancer Immunol Immunother. 2003 Feb; 52(2):80-8. Epub 2003 Jan 29.
- (50) ---- Jordan W, Faehling H, Krause J, Felix R.
Magnetic fluid hyperthermia (MFH).
In Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, ed. by Hafeli U, Plenum Press,
NewYork and London. 1997, 565-595
- (51) ---- Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K et al.
Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with
magnetic fluid hyperthermia.
J Magn Magn Mater 2001, 225: 118-126.
- (52) ---- Jordan A, Scholz R, Wust P, Föhling H, Felix R.
Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of
biocompatible superparamagnetic nanoparticles.
J Magn Magn Mater 201, 1999; 413-419
- (53) ---- Jordan A, Scholz R, Wust P, Fahling H, Krause J, Włodarczyk W, Sander B, Vogl T, Felix R.
Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo.
Int J Hyperthermia 1997; 13:587-605.

- (54) ---- Jordan A, Wust P, Fahling H, John W, Hinz A, Felix R.
Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia.
Int J Hyperthermia 1993; 9: 51-68.
- (55) ---- Jordan A, Wust P, Scholz R, Tesche B, Fahling H, Mitrovics T, Vogl T, Cervos-Navarro J, Felix R.
Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human carcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro.
Int J Hyperthermia 1996;12(6):705-722.
- (56) ---- Joubert JC.
Magnetic microcomposites as vectors for bioactive agents: the state of art.
Annales de Quimica Int. Ed. 1997, 93 : 570-576.
- (57) ---- Kim DK, Zhang Y, Voit W, Rao KV, Kehr J, Bjelke B and Muhammed M.
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bio-medical applications.
Scripta mater. 44; 2001 1713-1717
- (58) ---- Kirpensteijn J, van den Bos R, Endenburg N.
Adaptation of dogs to the amputation of a limb and their owners' satisfaction with the procedure.
Vet Rec 1999, 144: 115
- (59) ---- Kong G, Braun RD, Dewhirst MW.
Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature.
Cancer Research 2001, 61, April 1;3027-3032
- (60) ---- Kong G, Braun RD, Dewhirst MW.
Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size.
Cancer Res. 2000 Aug 15; 60(16):4440-5.
- (61) ---- Kodama RH.
Magnetic nanoparticules.
J Magn Magn Mater 1999, 200: 359-372.
- (62) ---- Kraegel SA, Madewell BR, Simonson E, Gregory CR.
Osteogenic sarcoma and cisplatin chemotherapy in dogs: 16 cases (1986-1989).
J Am Vet Med Assoc 1991, 199: 1057-1059
- (63) ---- Kubista B, Trieb K, Blahovec H, Kotz R, Micksche M.
Hyperthermia increases the susceptibility of chondro- and osteosarcoma cells to natural killer cell-mediated lysis.
Anticancer Res. 2002 Mar-Apr; 22(2A):789-92.
- (64) ---- Lamb CR, Berg J, Bengston AF.
Preoperative measurement of canine primary bone tumors, using radiography and bone scintigraphy.
J Am Vet Med Assoc. 1990 May 1; 196(9):1474-8.
- (65) ---- LaRue SM, Withrow SJ, Powers BE, Wrigley RH, Gillette EL, Schwarz PD, Straw RC, Richter SL.
Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs.
J Am vet Med Assoc 1989, 195: 17-34
- (66) ---- Lubbe AS, Bergemann C, Brook J, McClure DG.
Physiological aspects in magnetic drug targeting.
J Magn Magn Mater 1999; 194-149
- (67) ---- MacEwen EG, Kurzman ID, Rosenthal RC, Smith BW, Manley PA, Roush JK, Howard PE.
Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide.
J Natl Cancer Inst 1989, 81: 935

- (68) ---- Magnol J-P, Marchal Th, Delisle F, Devauchelle P, Fournel C.
Cancérologie clinique du chien, 1998, 426 p.
- (69) ---- Mathon D, Chanoit G, Autefage A.
Techniques de traitement des pertes de substance osseuse diaphysaire. Revue bibliographique.
Revue Méd. Vét., 1999, 150(12) : 929-946.
- (70) ---- Midsorp W, Hart AAM.
Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma.
J Natl Cancer Inst, 1979, 62: 537
- (71) ---- Moore A, Marecos E, Bogdanov A Jr, Weissleder R.
Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model.
Radiology. 2000 Feb;214(2):568-574.
- (72) ---- Moroz P, Jones SK, Metcalf C, Gray BN.
Hepatic clearance of arterially ferromagnetic particles.
Int J Hyperthermia, 2003, 19(1);23-34.
- (73) ---- Morris J and Dobson J.
Skeletal System.
In: Small Animal Oncology. Blackwell Science, 2001: 78-91
- (74) ---- Morrison WB.
Cancer in dogs and cats. Medical and surgical management.
Baltimore: Williams and Wilkins, 1998, 1500p.
- (75) ---- Pankhurst QA, Conolly J, Jones SK and Dobson J.
Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Topical review.
J Phys D: Appl Phys 2003, 36: 167-181.
- (76) ---- Rand RW, Snow H, Elliot DG, Snyder M.
Thermomagnetic surgery for cancer.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 1981, 6: 265-272.
- (77) ---- Rabin Y.
Is intracellular hyperthermia superior to extracellular hyperthermia in the thermal sense?
Int J Hyperthermia 2002, 18(3): 194-202.
- (78) ---- Ruuge E, Rusetski AN.
Magnetic fluids as drug carriers: targeted transport of drugs by a magnetic field.
J Magn Magn Mater 122, 1993;335-339
- (79) ---- Schraub S.
La radiothérapie.
Enseignement à la Faculté de médecine – U.L.P.-Strasbourg 2003, 95-110.
- (80) ---- Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, Henderson RA, MacEwen G, Mauldin N, McCaw DL, et al..
Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988).
J Am Vet Med Assoc 1992, 200: 995
- (81) ---- Stockhaus C, Schoon HA, Scharvogel S, Teske E.
Die Bedeutung der zytologie für den nachweis von knochentumoren bei hund und katze.
Tierärztl Praxis 2003, 31(2): 117-123.
- (82) ---- Straw RC, Withrow SJ.
Limb sparing surgery versus amputation for dogs with bone tumors.
Vet Clin North Am. 1996, 26: 135-143

- (83) ---- Straw RC, Withrow SJ, Richter SL, Powers BE, Klein MK, Postorino NC, LaRue SM, Ogilvie GK, Vail DM, Morrison WB, et al.
Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma.
J Vet Intern Med 1991 5(4): 205-210.
- (84) ---- Suter PF, Lord PF.
Radiographic differentiation of disseminated pulmonary parenchymal diseases in dogs and cats.
Vet Clin North Am 1974, 4(4):687-710.
- (85) ---- Thompson KJ, Pool RR.
Tumors of bones.
In: MEUTEN D.J. Tumors in animals. A Blackwell Publishing Company, 4th ed., 2002: 245-317.
- (86) ---- Wilhem C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri J-C, Gazeau F.
Intracellular uptake of superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating.
Biomaterials 24, 2003;1001-1011
- (87) ---- Wykes PM, Withrow SJ, Powers BE, Park RD.
Closed biopsy for diagnosis of long bone tumors: accuracy and results.
J Am Anim Hosp Assoc 1985, 21: 489
- (88) ---- Zhang Y, Kohler N, Zhang M.
Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.
Biomaterials 23; 2002 1553-1561